

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SANDRA MARA ROTTER CUROTTO

DETECÇÃO MICROSCÓPICA E MOLECULAR DE *Plasmodium* sp. EM
CAPIVARAS (*Hydrochaeris hydrochaeris*) DO REFÚGIO BELA VISTA EM FOZ DO
IGUAÇU - PARANÁ

CURITIBA

2009

SANDRA MARA ROTTER CUROTTO

DETECÇÃO MICROSCÓPICA E MOLECULAR DE *Plasmodium* sp. EM
CAPIVARAS (*Hydrochaeris hydrochaeris*) DO REFÚGIO BELA VISTA EM FOZ DO
IGUAÇU - PARANÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Patologia Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Ivan Roque de Barros Filho

CURITIBA

2009

Curotto, Sandra Mara Rotter

Detecção microscópica e molecular de *Plasmodium sp.* em capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) do Refúgio Bela Vista, Foz do Iguaçu, Paraná / Sandra Mara Rotter Curotto.— Curitiba, 2009.

122 f.

Orientador: Ivan Roque de Barros Filho.

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

1. Protozoologia veterinária – Foz do Iguaçu (PR). 2. Doenças transmissíveis em animais – Foz do Iguaçu (PR). 3. Capivara – Parasito – Foz do Iguaçu (PR). 4. Malária. I. Título.

CDU 619.693.6(816.22)

CDD 636.089696

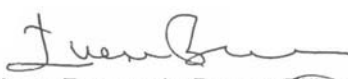
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS




PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada “DETECÇÃO MICROSCÓPICA E MOLECULAR DE *Plasmodium* sp. EM CAPIVARAS (*Hydrochaeris hydrochaeris*) DO REFÚGIO BELA VISTA EM FOZ DO IGUAÇÚ – PR” apresentada pela Mestranda SANDRA MARA ROTTER CUROTTO, declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 78 da Resolução nº 62/03–CEPE/UFPR, que considerou a candidata Apta para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Patologia Veterinária.

Curitiba, 18 de fevereiro de 2009


Prof. Dr. Ivan Roque de Barros Filho
Presidente/Orientador


Prof. Dr. Stênio Perdigão Fragoso
Membro


Prof. Dr. Marcelo Beltrão Molento
Membro

Aos meus pais, Claudio e Adevanilde,
os responsáveis por eu ter chegado até aqui.
Por todo esforço, amor e apoio imensuráveis...
E por me incentivarem desde sempre a seguir por esse caminho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao Ivan, meu orientador, pela oportunidade, confiança e por toda a atenção durante esses dois anos de mestrado, além das preciosas correções e sugestões na dissertação. Ao Biondo, por toda a ajuda e por me oferecer a oportunidade de trabalhar com esse projeto de pesquisa. Ao Prof. Stênio por aceitar fazer parte da minha banca de avaliação.

Aos meus colegas do mestrado, principalmente à Fernanda Ferreira, Flávia, Luciana e Simone e aos professores das disciplinas que cursei, com certeza o que aprendi durante as aulas levarei para toda a vida! Ao pessoal da coordenação da pós graduação. Aos integrantes do meu Comitê de Orientação, Prof. Molento e em especial à Prof. Rosangela, pelo apoio e incentivo quando decidi cursar o mestrado.

Meus agradecimentos especiais ao PDTA/PTI, da Itaipu Binacional, pelo pagamento da bolsa de estudos. Aos meus “orientadores” de Itaipu: Leonilda, Wanderlei e Zalmir, agradeço de coração toda a ajuda, a oportunidade que me foi ofertada no trabalho conjunto, além de toda a paciência e conhecimento adquirido durante meu período de estágio. Também aos colegas que fiz na Itaipu: o pessoal do Laboratório Ambiental, Maira, Marcelo, Carlos, Sandra, Muriel, e os funcionários Luis, D. Oli e Célia; e à Rosana e ao Marcos do Refúgio, agradeço muito toda a ajuda e amizade! Os momentos que passei com todos vocês com certeza contribuíram muito para o meu crescimento e para a realização desse trabalho. Agradeço em especial às amigas queridas que ganhei: Renatinha e Thaís, minhas lindas veterinárias de selvagens, companheiras de hotel, de estágio e de passeios em Foz. A nossa convivência foi essencial e elas são especiais no desenvolvimento desse trabalho.

A todos que participaram das coletas, muito obrigada! Ana Márcia, Juliano, Larissa, Fer Monego, Rafael Vieira, Rafael Stel, Jemima, Dorli, Carlão, Cris Schwartz, Marco, Biondo, Ivan, Leonilda, Robes e os tratadores do Refúgio...

Ao pessoal do Laboratório de Malária do SUCEN, especialmente à Dr. Karin, que realizou as PCRs, me ensinou muito e foi indispensável na realização dessa pesquisa.

À Maria Angela do Centro de Diagnóstico Marco Enrietti, por estar sempre à

disposição quando era preciso pegar material no freezer. E à Regina, que disponibilizou tempo, espaço e paciência para a realização das extrações! Muito obrigada pela ajuda!

Às pesquisadoras da Universidade de Purdue, Dr. Joanne Messick e Dr. Andrea pelo fornecimento dos primers. À farmacêutica Márcia, do Setor de Hematologia do Laboratório Municipal de Curitiba, pelo fornecimento da amostra positiva de malária.

Às funcionárias do Lacen, especialmente à Sueli e à Irina, que além de toda a paciência durante o estágio, foi indispensável durante a realização da segunda parte prática e com seus conselhos, ajuda e correção fundamentais durante a digitação dessa dissertação. Às minhas companheiras de estágio e amigas queridas: Ju, Lari e Rubi.

Aos meus amigos: Marco, Luis Felipe, Marina, Fer Fortes e Fer Monego. Pela agradável convivência durante essa importante fase das nossas vidas... Só a gente sabe o que passa pra chegar até aqui! Por estarem comigo em horas boas e ruins, por tudo que me ensinaram e por tudo que conquistamos juntos... Muito obrigada por existirem! Não tenho palavras para expressar o quanto significam pra mim. Amo muito vocês, pra sempre! Ao meu mais novo querido amigo Daniel, por escutar os meus lamentos e me fazer rir nas horas mais tensas! e pela preciosa ajuda na estatística!

À minha mãe pela realização da estatística, pela correção crítica ao texto e ao conteúdo desse trabalho e por suas sábias palavras em momentos providenciais! Ao meu pai Claudio, pelo desenho do recinto de captura das capivaras e pelos conselhos acadêmicos, sempre bem vindos!

E à toda minha família, que de longe ou de perto me apoiou durante o mestrado, especialmente às minhas primas Camila, Carol e Helô, que se tornaram minhas irmãs e amigas! Por me ouvirem, às vezes mesmo sem entender nada; e por me receberem sempre com carinho e amor gratuitos!! Amo vocês!!

Em especial, agradeço aos animais desse estudo. A finalidade maior desse trabalho é que tudo o que for aprendido se reverta em benefício deles, assim como é o objetivo de cada passo da minha profissão, sempre.

*Chegará o dia em que os homens conhecerão o íntimo dos animais
E nesse dia, um crime contra um animal será um crime contra a humanidade.*

(Leonardo da Vinci)

*Todos os animais são iguais e têm direito à existência.
Todo o animal tem o direito de ser respeitado e de ter proteção do homem.
Todo o animal selvagem tem o direito de ser livre...*

(Declaração Universal dos Direitos do Animais – UNESCO)

RESUMO

A malária é uma das doenças infecciosas mais importantes do mundo, por suas altas taxas de incidência e mortalidade. O agente causador, *Plasmodium* spp., representa um grupo extremamente bem sucedido de protozoários, ao qual pertencem várias espécies que infectam uma variedade de hospedeiros vertebrados, desde mamíferos até aves e répteis. Em roedores e primatas não humanos, a malária é muito utilizada como modelo experimental, e existe disponível uma grande quantidade de informação a respeito da doença em animais infectados experimentalmente. Mas em outros animais mamíferos é ainda pouco estudada e carente de pesquisas. Nessa dissertação, relata-se um trabalho de pesquisa por microscopia e PCR de *Plasmodium* sp. em capivaras do Refúgio Biológico Bela Vista, da Itaipu Binacional em Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil. Como revisão bibliográfica, foram apresentados dois capítulos: no primeiro fez-se uma revisão sobre as publicações de achados de infecção por *Plasmodium* em mamíferos não humanos no mundo e no segundo foi exposto uma síntese dos métodos de diagnóstico laboratoriais de *Plasmodium* spp. em mamíferos. Para a realização da pesquisa, foram coletadas amostras de sangue total de 33 capivaras de cativeiro e de vida livre e foram realizados hemograma, pesquisa do parasita por microscopia ótica e por PCR *nested*, tendo como alvo sequências no *ssrRNA* e sequenciamento dos produtos obtidos. Pela microscopia, de 31 animais, apenas um apresentou parasitemia (3,2%). Pela PCR, do total de 33, três foram positivos (9%), incluindo o positivo pela microscopia. Os fragmentos sequenciados de duas amostras apresentaram 73,8% de similaridade com espécies infectantes de primatas; 73% com espécies de roedores; 75% com espécies de aves e 77,2% com espécies infectantes de lagartos. A presença da infecção por *Plasmodium* sp. não alterou os valores dos hemogramas. Conclui-se que a capivara pode ser hospedeira natural de *Plasmodium* sp, e o parasita parece ser uma nova espécie. A parasitemia e a ocorrência encontradas foram baixas e a PCR foi mais sensível que a microscopia. Com esse trabalho, percebe-se a necessidade de pesquisas para se elucidar as susceptibilidades à infecções e parasitoses e respectivas epidemiologias nas capivaras e fica clara a importância do uso de ferramentas diagnósticas como auxílio na medicina veterinária.

Palavras-chave: *Hydrochaeris hydrochaeris*. *Plasmodium*. Diagnóstico.

ABSTRACT

Malaria is one of the most important infectious diseases due to its high incidence and mortality rates. The causing agent, *Plasmodium* spp., represents an extremely succeeded protozoan group, to which belong several species that infect a variety of vertebrates hosts, from mammals to avian and reptiles. In rodents and non human primates, malaria is very used as model, and there are available a lot of information about the disease in animals experimentally infected. But in other mammals there are few studies and research is lacking. On this dissertation, are reported a survey of *Plasmodium* sp. by microscopy and PCR in capybaras of the Bela Vista Biological Sanctuary, of Itaipu Binational in Foz do Iguassu, Parana, Brazil. As a bibliography review, was presented two chapters: on the first are reviewed the reports about *Plasmodium* infection in mammals, and on the second was presented a review of the laboratorial diagnosis methods for mammal *Plasmodium* spp. For the survey, it was collected total blood samples from 33 captive and wild capybaras, and CBCs, light microscopy and *nested* PCR was performed, using sequences on the *ssrRNA* gene as target and sequencing the products. Through microscopy, from 31 animals, just one revealed positive parasitemia (3.2%). The PCR showed three positives (9%), from the total of 33, including the microscopy positive. The sequenced fragments from two samples presented 73.8% of similarity to primate species; 73% to rodent species; 75% to avian species; and 77.2% to species from lizards. The *Plasmodium* sp. infection did not altered the CBC results. It is concluded that the capybara could be a natural host of *Plasmodium* sp, and the parasite found seems to be a new species. The parasitemia and occurrence was low and PCR was more sensitive than microscopy. With this work, it was observed the research necessity for elucidate the infection and parasitic diseases susceptibilities and respective epidemiology in capybaras and is clear the importance of using diagnostic tools in veterinary medicine.

Key words: *Hydrochaeris hydrochaeris*. *Plasmodium*. Diagnosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – TROFOZOÍTO DE <i>Plasmodium</i> sp. ENCONTRADO NO ESFREGAÇO SANGUÍNEO DE UMA CAPIVARA DE VIDA LIVRE	68
FIGURA 2 – PLANTA BAIXA DO RECINTO DE CAPTURA.....	72
FIGURA 3 – RECINTO DE CAPTURA DE CAPIVARAS DE VIDA LIVRE – ITAIPU BINACIONAL, FOZ DO IGUAÇU: ÁREAS DE CAPTURA	73
FIGURA 4 – RECINTO DE CAPTURA DE CAPIVARAS DE VIDA LIVRE – ITAIPU BINACIONAL, FOZ DO IGUAÇU: ÁREAS DE MANEJO	74
FIGURA 5 – COLETAS DE SANGUE DE CAPIVARAS DO RBV - ITAIPU	76
FIGURA 6 – TROFOZOÍTOS DE <i>Plasmodium</i> sp. EM ESFREGAÇO DA CAPIVARA DE CATIVEIRO NÚMERO 9.....	83
FIGURA 7 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1,5% DA AMOSTRA POSITIVA	84
FIGURA 8 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% DE AMOSTRAS DE CAPIVARAS DE CATIVEIRO	85
FIGURA 9 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DAS ESPÉCIES DE <i>Plasmodium</i> DESCRITAS NO QUADRO 9 E DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS DAS DUAS CAPIVARAS, COMPARADAS POR SEQUÊNCIAS DO <i>ssrRNA</i>	87

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - ESPÉCIES DE <i>Plasmodium</i> DESCRITAS EM PRIMATAS NÃO HUMANOS DO VELHO MUNDO E SEUS RESPECTIVOS HOSPEDEIROS NATURAIS E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA	25
QUADRO 2 - ESPÉCIES DE <i>Plasmodium</i> DESCRITAS EM PRIMATAS CEBIDAE DA AMÉRICA DO SUL E SEUS RESPECTIVOS HOSPEDEIROS NATURAIS	26
QUADRO 3 - ESPÉCIES E SUBESPÉCIES DE <i>Plasmodium</i> DESCRITOS EM ROEDORES DA FAMÍLIA MURIDAE, SEUS HOSPEDEIROS NATURAIS E DISTRIBUIÇÕES GEOGRÁFICAS.....	33
QUADRO 4 - ESPÉCIES DE <i>Plasmodium</i> DESCRITOS EM MAMÍFEROS NÃO PRIMATAS E NÃO MURÍDEOS E SEUS RESPECTIVOS HOSPEDEIROS E LOCAIS DE DESCRIÇÃO	41
QUADRO 5 – DADOS DAS CAPIVARAS DE CATIVEIRO DO RBV – ITAIPU BINACIONAL, FOZ DO IGUAÇU	70
QUADRO 6 – SOLUÇÃO ESTOQUE DO TAMPÃO DE LISE DE HEMÁCIAS RCLB 5X	79
QUADRO 7 – NOMES E SEQUÊNCIAS DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NOS DOIS PROTOCOLOS DE PCR (PCR A E PCR B)	80
QUADRO 8 – CONDIÇÕES DAS TERMOCICLAGENS EM CADA REAÇÃO DE PCR, NOS DOIS PROTOCOLOS UTILIZADOS	81
QUADRO 9 – NÚMEROS DE ACESSO NO GENBANK DAS SEQUÊNCIAS DE <i>ssrRNA</i> DE DIFERENTES ESPÉCIES DE <i>Plasmodium</i> USADAS PARA O ALINHAMENTO COM AS SEQUÊNCIAS DAS CAPIVARAS.....	86
QUADRO 10 – PORCENTAGEM DE SIMILARIDADE ENTRE AS SEQUÊNCIAS DE <i>ssrRNA</i> DAS ESPÉCIES DE <i>Plasmodium</i> DOS DIFERENTES GRUPOS DE HOSPEDEIROS	86

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DOS HEMOGRAMAS E PROTEÍNA PLASMÁTICA TOTAL DE 10 CAPIVARAS DE CATIVEIRO.....	89
TABELA 2 – MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DOS HEMOGRAMAS E PROTEÍNA PLASMÁTICA TOTAL DE 21 CAPIVARAS DE VIDA LIVRE	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	- porcentagem
°C	- graus celsius
CHCM	- concentração de hemoglobina corpuscular média
dI	- decilitro
DNA	- ácido desoxirribonucleico
dNTP	- desoxirribonucleosídeo trifosfatado
EDTA	- ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	- ensaio imunoenzimático
g	- grama
HCl	- ácido clorídrico
HCM	- hemoglobina corpuscular média
IBAMA	- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
KCl	- cloreto de potássio
kg	- quilogramas
LACEN-PR	- Laboratório Central do Estado do Paraná
M	- molar
MgCl ₂	- cloreto de magnésio
ml	- mililitros
mM	- milimolar
mm	- milímetros
nm	- nanômetros

pb	- pares de base
PCR	- reação em cadeia da polimerase
RBV	- Refúgio Biológico Bela Vista
RIFI	- reação de imunofluorescência indireta
RNA	- ácido ribonucleico
rpm	- rotações por minuto
ssrRNA	- RNA da subunidade pequena do ribossomo
SUCEN	- Superintendência de controle de endemias
TBE	- tampão tris-borato-EDTA
Tris	- hidroximetilaminometano
U	- unidade
VCM	- volume corpuscular médio
μ l	- microlitros
μ M	- micromolar
V	- volt

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVO GERAL	20
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
2 MALÁRIA EM MAMÍFEROS SILVESTRES	21
2.1 INTRODUÇÃO	23
2.2 PRIMATAS	24
2.2.1 Hospedeiros naturais.....	24
2.2.2 Uso como modelos experimentais	28
2.2.3 A malária como zoonose	29
2.3 ROEDORES	31
2.3.1 Histórico murino	31
2.3.2 Uso como modelos experimentais	34
2.4 OUTROS MAMÍFEROS	38
2.5 CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS.....	43
3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE <i>Plasmodium</i> spp.	50
3.1 INTRODUÇÃO	52
3.2 MICROSCOPIA.....	53
3.2.1 Ótica	53
3.2.2 Fluorescência	54
3.3 TESTES IMUNOLÓGICOS	55
3.4 TESTES IMUNOCROMATOGRÁFICOS.....	57
3.5 MÉTODOS BASEADOS EM REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	58
3.5.1 PCR em tempo real	59
3.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
REFERÊNCIAS.....	61
4 DETECÇÃO DE <i>Plasmodium</i> sp. EM CAPIVARAS DE VIDA LIVRE E DE CATIVEIRO DO REFÚGIO BIOLÓGICO BELA VISTA – ITAIPU BINACIONAL, FOZ DO IGUAÇU, PARANÁ.....	65
4.1 INTRODUÇÃO	67
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	69

4.2.1 Local de estudo	69
4.2.2 Animais e amostras	69
4.2.2.1 Animais de cativeiro	69
4.2.2.2 Animais de vida livre.....	70
4.2.3 Contenção química	75
4.2.4 Colheita e armazenamento das amostras	75
4.2.5 Hemograma.....	77
4.2.6 Proteína plasmática total	77
4.2.7 Pesquisa de <i>Plasmodium</i> sp. por microscopia ótica	77
4.2.8 Extração de DNA.....	78
4.2.9 Quantificação de DNA.....	79
4.2.10 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	79
4.2.11 Visualização dos produtos.....	81
4.2.12 Sequenciamento	82
4.2.13 Análise estatística	82
4.3 RESULTADOS	83
4.3.1 Microscopia	83
4.3.2 Extração do DNA.....	84
4.3.3 PCR e sequenciamento.....	84
4.3.4 Hemograma e proteína plasmática total.....	88
4.4 DISCUSSÃO	90
4.5 CONCLUSÕES	96
REFERÊNCIAS.....	97
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	101
REFERÊNCIAS.....	102
APÊNDICE.....	105
ANEXOS	107

1 INTRODUÇÃO

Há mais de 100 anos foi descoberto que o *Plasmodium*, um protozoário parasita obrigatório, é o causador da malária, um flagelo da humanidade desde a antiguidade (COWMAN e CRABB, 2006). Cerca de 40% da população mundial está exposta à infecção, principalmente nos países de áreas tropicais e subtropicais (WHO, 2005). Em 2006, foram registrados cerca de 1,9 - 3,3 milhões de casos novos no mundo, ocasionando cerca de 0,6 - 1,2 milhões de mortes, sendo que 80% dos casos e 90% das mortes ocorreram na África (WHO, 2008). Juntamente com a tuberculose e a síndrome da imunodeficiência adquirida, a malária é uma das três doenças infecciosas mais importantes do mundo, por seu impacto particularmente em termos de morbidade, mortalidade e consequências econômicas deletérias (HUNT *et al.*, 2006).

Esse parasita representa um gênero extremamente bem sucedido, ao qual pertencem várias espécies que infectam uma variedade de hospedeiros vertebrados, desde mamíferos até aves e répteis (COWMAN e CRABB, 2006). O gênero *Plasmodium* faz parte do filo Apicomplexa, classe Sporozoea, ordem Haemosporidae e família Plasmodiidae. Os Hemosporídios são um grupo peculiar de protistas heteroxenos, claramente destacados filogeneticamente, que parasitam anfíbios, répteis, aves e mamíferos e utilizam insetos dípteros (Insecta:Diptera) como vetores (VALKIUNAS, 2005).

O filo Apicomplexa é um grande e bem sucedido grupo de parasitas intracelulares, que inclui protozoários de importância para a medicina e medicina veterinária, como o *Toxoplasma*, a *Theileria*, a *Eimeria*, a *Babesia* e o *Cryptosporidium*. A não ser pela diferença de hospedeiros ou modo de transmissão, esses parasitas possuem muitas características em comum, incluindo um complexo apical especializado que é central ao processo de invasão da célula hospedeira (COWMAN e CRABB, 2006). As formas invasivas tem que ser capazes de reconhecer e invadir uma célula hospedeira adequada em cada estágio e a sobrevivência e transmissão do parasita dependem desses processos (GAUR *et al.*, 2004).

No seu ciclo de vida, os parasitas do gênero *Plasmodium* se diferenciam em várias formas morfolologicamente distintas nos hospedeiros vertebrados e no inseto vetor, alternando estágios invasivos e de replicação, entrepostos por uma única fase

se desenvolvimento sexuado, a qual medeia a transmissão entre o hospedeiro vertebrado e o mosquito (HALL *et al*, 2005).

A malária nos mamíferos é transmitida por fêmeas de mosquitos *Anopheles*, que inoculam formas esporozoítas no hospedeiro durante a alimentação sanguínea. Essas formas extracelulares migram rapidamente para o fígado pela corrente sanguínea e invadem os hepatócitos. Cada esporozoíto invasor se diferencia e divide mitoticamente em milhares de merozoítos hepáticos que, quando liberados, invadem eritrócitos, começando o ciclo sanguíneo assexuado (COWMAN e CRABB, 2006). O estágio eritrocítico que se inicia consiste em replicações por esquizogonia, com formação de novos merozoítos que invadirão outros eritrócitos. Esse ciclo sanguíneo se repetirá sucessivas vezes em intervalos de tempo variados, dependendo da espécie de *Plasmodium*, e essa fase do desenvolvimento do parasita é a que causa todos os sintomas e alterações patológicas da doença (HALDAR e MOHANDAS, 2007).

Após algumas gerações, alguns dos merozoítos eritrocíticos se desenvolvem em formas sexuadas do parasita, os gametócitos machos ou fêmeas (BRAGA e FONTES, 2005). Ocorre então a maturação por alguns dias, o que varia dependendo da espécie, antes da circulação de gametócitos maduros na corrente sanguínea, e posterior ingestão pelo vetor (SINDEN, 1998). O gametócito feminino matura em macrogameta e o gametócito masculino, por um processo denominado exflagelação, dá origem à oito microgametas. Em cerca de 20 a 30 minutos, ocorrerá a fecundação, formando o ovo ou zigoto. Após 24 horas o zigoto se desenvolve em oocineto, que possui movimentação e vai se encistar no epitélio do intestino médio. Ocorre o processo de divisão esporogônica e, após 9 a 14 dias, ocorre a ruptura da parede do oocisto e a liberação dos esporozoítos. Estes serão disseminados por todo o organismo do inseto e atingem as células das glândulas salivares e depois o ducto salivar, para serem injetados no hospedeiro vertebrado juntamente com a saliva no próximo repasto sanguíneo (BRAGA e FONTES, 2005; COWMAN e CRABB, 2006).

A malária nos seres humanos se caracteriza como uma enfermidade sistêmica, febril e aguda, cuja gravidade e curso dependem da espécie e cepa do parasita infectante, além do grau de imunidade do hospedeiro. Há geralmente aparecimento de anemia, hepato e esplenomegalia, alterações renais e hipoglicemia (ANDRADE, 2005). As espécies infectantes são quatro: *Plasmodium falciparum*,

Plasmodium vivax, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium malariae*. Dessas, a menos comum é o *P. ovale*, restrito ao oeste da África. O *P. malariae* é distribuído mundialmente mas apresenta baixa frequência e o mais amplamente distribuído é o *P. vivax* (TUTEJA, 2007). No Brasil, existem as espécies *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. vivax*, sendo a última a mais comum e responsável por mais de 80% dos casos em 2005 (FUGIKAHARA *et al.*, 2007).

O *P. falciparum* causa a forma mais virulenta das malárias humanas, por infectar eritrócitos em qualquer estágio e resultar em parasitemias altas, o que pode causar complicações e morte, na maioria das vezes em indivíduos não imunes. A infecção também pode resultar em estágios dormentes hepáticos do parasita, que acarretam em recorrências da infecção em meses ou anos. O *P. vivax* e o *P. ovale* infectam apenas reticulócitos, causando baixa parasitemia e induzindo a sintomas brandos, restritos a febres, com raras complicações. O *P. malariae* só afeta formas maduras dos eritrócitos e resulta em malária sintomática branda, porém a infecção é crônica e pode persistir por décadas (HALDAR e MOHANDAS, 2007; BLEVINS *et al.*, 2008; SAFEUKUI *et al.*, 2008).

No Brasil, a região amazônica possui características geográficas e ecológicas altamente favoráveis à interação do parasita com o vetor, constituindo-se portanto, em uma área de alto e médio risco de infecção (MARQUES e GUTIERREZ, 1994). Fora dessa região, a malária está restrita às áreas com floresta tropical remanescente (CERUTTI-JÚNIOR *et al.*, 2007). Em 2007 foram registrados cerca de 457 mil casos novos no país, quase na sua totalidade na região da Amazônia legal, onde a doença acarretou em 52 mortes (BRASIL, 2008).

O Paraná encontra-se entre os estados receptivos para a transmissão da doença fora da região amazônica. As áreas consideradas de maior risco para o contágio da doença no Paraná são as regiões oeste e noroeste do estado, em decorrência da presença natural do mosquito vetor. Foram registrados em 2004 cinco casos autóctones, ocorridos na cidade de Foz do Iguaçu. Os últimos casos no estado ocorreram em 2008, quando 75 foram confirmados, sendo 15 autóctones e 60 importados de outras regiões (AEN, 2007; BRASIL, 2009). Segundo Ferreira (1996) migrações entre o oeste de Paraná e a região amazônica e os movimentos pendulares da população entre o oeste do Paraná e o Paraguai facilitam a reintrodução contínua do agente etiológico e a ocorrência de casos autóctones de malária na área de influência do reservatório de Itaipu, que é a causa direta da

manutenção do vetor da malária na região (FALAVIGNA-GUILHERME *et al.*, 2005).

A infecção causada por *Plasmodium* spp. em roedores e primatas não humanos é muito utilizada como modelo experimental na pesquisa da malária (LANDAU e GAUTRET, 1998; PERKINS *et al.*, 2007), e existe disponível uma grande quantidade de informação a respeito da doença em animais infectados experimentalmente. Porém, a malária em outros animais mamíferos é ainda pouco estudada e carente de pesquisas.

Em relação a capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*), o animal objeto desse trabalho, não foram encontrados relatos dela agindo como hospedeira, seja naturalmente ou experimentalmente infectada. Esse grande herbívoro constitui a única espécie e único gênero da família Hydrochaeridae (SAINSBURY, 2003) e é o maior animal da ordem Rodentia existente na Terra. Encontrado nas Américas Central e do Sul, desde o Panamá, leste dos Andes até o norte da Argentina, ocorre em todos os estados brasileiros. De hábitos semiaquáticos, alimentam-se de vegetação, principalmente gramíneas em várzeas e plantas aquáticas (LANGE e SCHMIDT, 2007).

Nessa dissertação, relata-se um trabalho de pesquisa por microscopia e reação em cadeia da polimerase (PCR) de *Plasmodium* sp. em capivaras do Refúgio Biológico Bela Vista da Itaipu Binacional em Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil. Como embasamento teórico, foi realizada uma revisão bibliográfica em forma de capítulos, com dois trabalhos distintos. No primeiro procurou-se fazer uma revisão sobre as publicações de achados de infecção por *Plasmodium* em mamíferos no mundo e no segundo foi exposto uma síntese dos métodos de diagnóstico laboratoriais de *Plasmodium* spp. em mamíferos, com ênfase nos parasitas infectantes de seres humanos. A última parte do trabalho é o relato da pesquisa do parasita nas populações de cativeiro e de vida livre de capivaras em Itaipu. Foi descrita a metodologia e os resultados da captura e coleta de amostras dos animais, realização de hemogramas, exame de microscopia ótica, PCR e sequenciamento dos produtos amplificados.

1.1 OBJETIVO GERAL

Detectar a presença de parasitas do gênero *Plasmodium* nas capivaras de cativeiro e de vida livre do Refúgio Biológico Bela Vista, por microscopia ótica e pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estabelecer a ocorrência de *Plasmodium* sp. nas populações de capivaras de cativeiro e de vida livre e detectar possíveis diferenças entre as duas.

Comparar os resultados obtidos pela pesquisa do parasita por microscopia ótica e por PCR.

Determinar se a infecção causa alteração hematológica, por meio de realização de hemograma nos animais.

2 MALÁRIA EM MAMÍFEROS SILVESTRES

RESUMO

Muito do conhecimento sobre a biologia do parasita da malária foi obtido de estudos de campo e de laboratório em modelos experimentais primatas e murinos. Essa revisão faz uma síntese das espécies de *Plasmodium* descritas no mundo que infectam mamíferos não humanos, com objetivo de se obter informações a respeito da malária nesses animais silvestres e discutir a importância e aplicações em estudos experimentais de algumas espécies. Em primatas, existem 29 espécies conhecidas de *Plasmodium* que parasitam grandes símios, macacos e lêmures. Três espécies são de chimpanzés e gorilas; duas de orangotangos; quatro infectam gibões; onze infectam macacos do Velho Mundo; duas infectam macacos do Novo Mundo; e sete espécies infectam lêmures. Existem muito poucos trabalhos disponíveis na literatura a respeito da patologia, sintomatologia ou tratamento de malárias em símios, assim como estudos de prevalência. Além da importância da utilização dos primatas em estudos experimentais, foi demonstrado que existe transmissão natural de malárias de seres humanos para outros primatas e vice-versa, merecendo destaque um grande foco de infecção por malária de macacos em seres humanos na Ásia. Em roedores murinos, são descritas cinco espécies que infectam ratos silvestres na África central e Egito. Em outros mamíferos, são conhecido como hospedeiros o porco espinho africano, morcegos, esquilos e ungulados. A grande maioria dos relatos de infecção por *Plasmodium* nesses animais são antigos e únicos, não se encontrando mais artigos sobre essas espécies de parasita. Conclui-se que a malária é uma doença de impacto mundial histórico e recente e os modelos animais, tanto roedores quanto primatas, tiveram e terão um crucial papel na realização de estudos experimentais. Além dessa importância como modelo experimental, a evidência da malária ser uma zoonose e o fato de animais silvestres poderem ser reservatórios de *Plasmodium* humanos nos faz concluir que estudos com primatas têm uma relevância inquestionável. Porém, a malária em mamíferos é ainda carente de esclarecimentos, sendo ainda necessários estudos para se definir as espécies de *Plasmodium* existentes, seus respectivos hospedeiros silvestres e distribuição geográfica, assim como a importância e as consequências do parasitismo nesses animais.

Palavras-chave: Malária. Mamíferos. Modelos experimentais.

MALARIA IN WILD MAMMALS

ABSTRACT

Much of the knowledge of malaria parasite biology was obtained from field and laboratory studies on murine and primate experimental models. This review summarises the *Plasmodium* species that are described infecting non-human mammals, with the aim of gaining information about these wild animals' malaria, and discuss the importance and applications in experimental studies of some species. In primates there are 29 *Plasmodium* known species described infecting simian, macaques and lemurs. Three infect chimpanzees and gorillas; two are from orangutans; four from gibbons; eleven infect New World and two Old World macaques; and seven are from lemurs. There are very few reports about simian malaria pathology, clinical signs and treatment, as well as studies of prevalence. Besides the importance of the use as models of the primates, it was demonstrated that there are natural transmissions of human malaria to other primates and vice versa, and a large focus of macaque malaria infection in human beings in Asia is of great concern. In murine rodents, there are five species which infect wild rats in Central Africa and Egypt. In other mammals, are known as hosts the African porcupine, bats, squirrels and ungulates. The great majority of *Plasmodium* infection reports in these animals are old and single, and additional works about these species could not be found. It is concluded that malaria are a disease of history and recent worldwide impact, and animal models, rodents and primates, had and will have a crucial role on experimental studies. Besides that importance as models, the evidence of malaria as a zoonose and the fact that wild animals could act as reservoirs of human *Plasmodium* lead the conclusion that primate studies have an unquestionable relevance. However, mammalian malaria yet need for clarification, and studies are necessary to define the existing *Plasmodium* species, their wild hosts and geographical distribution, as well as the parasitism importance and consequence in these animals.

Key words: Malaria. Mammals. Experimental models.

2.1 INTRODUÇÃO

Muito do conhecimento sobre a biologia do parasita da malária foi obtido de estudos de campo e de laboratório em modelos experimentais. As espécies de *Plasmodium* de roedores são intensivamente utilizadas no estudo da biologia básica do parasita, de sua bioquímica, interações entre hospedeiros e vetores, evolução da virulência e resposta à terapia medicamentosa. É fato que existem algumas diferenças entre as infecções no homem e em roedores, como por exemplo o funcionamento do sistema imune e a farmacocinética. Mas também é verdade que todas as espécies de *Plasmodium* que infectam mamíferos possuem ciclos de vida comparáveis e são sensíveis às mesmas drogas (LANDAU e GAUTRET, 1998; PERKINS *et al.*, 2007). Assim como os roedores, primatas não humanos têm sido amplamente utilizados para estudos pela sua proximidade filogenética a seres humanos e sua semelhança na relação parasita-hospedeiro (GYSIN, 1998).

Um aspecto interessante da distribuição do *Plasmodium* em mamíferos é a ocorrência irregular nas diversas ordens. Os parasitas são comuns entre os primatas, dos Lemuridae ao homem; são raros em roedores, exceto nas espécies murinas em regiões da África tropical e são ausentes em carnívoros, marsupiais e insetívoros. Algumas poucas espécies especializadas existem em morcegos, esquilos, porco-espinho e outros habitantes de florestas tropicais. A distribuição geográfica da malária em mamíferos também tende a ser restrita, limitada geralmente por ambientes silváticos. O homem é exceção, com hábitos migratórios, trouxe desde o início da evolução o parasita para fora da floresta, e estepes e savanas, onde entrou em contato com grande variedade de vetores anofelinos. A malária é quase ausente no Novo Mundo, com exceção das espécies parasitas de seres humanos e das duas de macaco (GARNHAM e KUTTLER, 1980).

Essa revisão faz uma síntese das espécies de *Plasmodium* descritas no mundo que infectam mamíferos não humanos, com objetivo de se obter informações a respeito da malária nesses animais silvestres. Procurou-se também discutir a importância e aplicações em estudos experimentais de algumas espécies.

2.2 PRIMATAS

2.2.1 Hospedeiros naturais

Existem 29 espécies de *Plasmodium* que parasitam grandes símios, macacos e lêmures. Três espécies são de chimpanzés e gorilas (*Pan troglodytes* e *Gorilla gorilla* na África central e oeste); duas de orangotangos (*Pongo pygmaeus* na Indonésia e Malásia); quatro infectam gibões (*Hylobates lar* e *Hylobates moloch* no sudeste da Ásia); onze infectam macacos do Velho Mundo (Família Cercopithecidae na África e Ásia); duas infectam macacos do Novo Mundo (das Famílias Cebidae e Atelidae na América do Sul); e sete espécies infectam lêmures (*Lemur* spp. em Madagascar) (GYSIN, 1998; LECLERC *et al.*, 2004). As espécies de *Plasmodium* que parasitam primatas não humanos e seus respectivos hospedeiros estão listados nos QUADROS 1 e 2.

Em lêmures (*Lemur macaco macaco*, *Lemur fulvus fulvus* e *Lemur fulvus rufus*), primatas inferiores prossímios, existem sete espécies de *Plasmodium* descritas (LANDAU *et al.* 1989; LEPERS *et al.*, 1989). Esses animais só existem na ilha de Madagascar, a sudeste do continente africano e foram encontrados apenas dois artigos que descrevem espécies de *Plasmodium* infectando esses animais. Essas únicas descrições foram feitas com base nas características morfológicas dos parasitas em esfregaços sanguíneos.

Das espécies de *Plasmodium* na América do Sul, o *Plasmodium brasilianum* tem uma vasta distribuição geográfica, sendo encontrado na floresta Amazônica no Panamá, Venezuela, Peru e Brasil, assim como na Mata Atlântica das regiões sul e sudeste do Brasil. Em uma abrangente revisão sobre malária símia no Brasil, foi demonstrado que *P. brasilianum* infecta todos os gêneros das famílias Cebidae e Atelidae, exceto *Aotus* (Cebidae), e raramente exemplares de *Saguinus midas niger* (Callithricidae). Já o *Plasmodium simium* foi encontrado somente em *Alouatta fusca clamitans* (bugio ruivo) e *Brachyteles arachnoides* (muriqui) de áreas do sul e sudeste da mata Atlântica (DEANE, 1992). Porém, a sua distribuição geográfica pode ser ainda mais ampla, levando-se em consideração que essas descrições foram baseadas apenas em análises de microscopia de sangue periférico, métodos que são de sensibilidade limitada (DUARTE *et al.*, 2008).

GRUPO E LOCAL	ESPÉCIE	HOSPEDEIRO
Chimpanzés e Gorilas África central e oeste	<i>Plasmodium reichenowi</i>	<i>Pan troglodytes</i> , <i>Gorilla gorilla</i>
	<i>Plasmodium rodhaini</i>	<i>Pan troglodytes</i> , <i>Gorilla gorilla</i>
	<i>Plasmodium schwetzi</i>	<i>Pan troglodytes</i> , <i>Gorilla gorilla</i>
Orangotangos Indonésia e Malásia	<i>Plasmodium pitheci</i>	<i>Pongo pygmaeus</i>
	<i>Plasmodium silvaticum</i>	<i>Pongo pygmaeus</i>
Gibões sudeste da Ásia	<i>Plasmodium eylesi</i>	<i>Hylobates lar</i>
	<i>Plasmodium jefferyi</i>	<i>Hylobates lar</i>
	<i>Plasmodium hylobati</i>	<i>Hylobates moloch</i>
	<i>Plasmodium youngi</i>	<i>Hylobates lar</i>
Macacos do Velho Mundo África central, sul e sudeste da Ásia	<i>Plasmodium coatneyi</i>	<i>Macaca fascicularis</i> (Malásia e Filipinas)
	<i>Plasmodium cynomolgi</i>	<i>Macaca spp.</i> , <i>Presbytis cristatus</i> , <i>Prebytis entellus</i> (sudeste da Ásia)
	<i>Plasmodium fieldi</i>	<i>Macaca nemestrina</i> (Malásia)
	<i>Plasmodium fragile</i>	<i>Macaca sinica</i> , <i>Macaca radiata</i> (Sri Lanka)
	<i>Plasmodium gonderi</i>	<i>Cercocebus spp.</i> , <i>Mandrillus leucophaeus</i> (Congo, Camarões)
	<i>Plasmodium inui</i>	<i>Cynopithecus niger</i> , <i>Macaca spp.</i> , <i>P. cristatus</i> , <i>Presbytis obscurus</i> (sudeste da Ásia)
	<i>Plasmodium knowlesi</i>	<i>M. fascicularis</i> , <i>M. nemestrina</i> , <i>Presbytis malalophus</i> (sudeste da Ásia)
	<i>Plasmodium shortti</i>	<i>M. radiata</i> (sul da Índia)
	<i>Plasmodium simiovale</i>	<i>M. sinica</i> (Sri Lanka)
	<i>Plasmodium georgesi</i>	<i>Cercocebus albigena</i> , <i>Cercocebus galeritus</i> (Quênia)
	<i>Plasmodium petersi</i>	<i>C. albigena</i> (Uganda)
Lêmures (Madagascar)	<i>Plasmodium foley</i>	<i>Lemur fulvus fulvus</i> , <i>Lemur fulvus rufus</i>
	<i>Plasmodium girardi</i>	<i>L. fulvus fulvus</i> , <i>L. fulvus rufus</i>
	<i>Plasmodium uilenbergi</i>	<i>L. fulvus fulvus</i>
	<i>Plasmodium sp.</i>	<i>L. fulvus fulvus</i>
	<i>Plasmodium percygarnhami</i>	<i>Lemur macaco macaco</i>
	<i>Plasmodium coulangesi</i>	<i>Lemur macaco macaco</i>
	<i>Plasmodium bucki</i>	<i>Lemur macaco macaco</i>

QUADRO 1 - ESPÉCIES DE *Plasmodium* DESCRITAS EM PRIMATAS NÃO HUMANOS DO VELHO MUNDO E SEUS RESPECTIVOS HOSPEDEIROS NATURAIS E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

FONTE: Adaptado de EYLES (1963), GYSIN (1998) e LECLERC *et al.* (2004)

ESPÉCIE	HOSPEDEIRO
<i>Plasmodium brasilianum</i>	<i>Alouatta</i> spp.
	<i>Ateles</i> spp.
	<i>Brachyteles arachnoides</i>
	<i>Cacajao calvus</i>
	<i>Callicebus</i> spp.
	<i>Cebus</i> spp.
	<i>Chiropotes satanas</i>
	<i>Lagothrix</i> spp.
	<i>Saimiri</i> spp.
	<i>Saguinus midas</i>
	<i>Pithecia pithecia</i>
<i>Plasmodium simium</i>	<i>Alouatta</i> spp.
	<i>Brachyteles arachnoides</i>

QUADRO 2 - ESPÉCIES DE *Plasmodium* DESCRITAS EM PRIMATAS CEBIDAE DA AMÉRICA DO SUL E SEUS RESPECTIVOS HOSPEDEIROS NATURAIS

FONTE: Adaptado de DEANE (1992), GYSIN (1998) e DE THOISY *et al.* (2000)

Existem poucos trabalhos disponíveis na literatura a respeito da patologia, sintomatologia ou tratamento de malárias em símios. Sabe-se que na maioria dos hospedeiros experimentais, a infecção é aguda, enquanto que no hospedeiro natural é crônica (OZWARA *et al.*, 2003).

Em orangotangos por exemplo, não há dados publicados descrevendo o grau de doença e mortalidade como causa direta da malária, portanto esse parasita é considerado benigno. Porém, isso deve ser esclarecido e merece cuidado, pois existem relatos de resposta de sinais clínicos compatíveis com a doença a tratamento antimalárico (REID *et al.*, 2006). Tarello (2005) relatou um caso de doença e morte de um chimpanzé criado como animal de estimação no Kuwait por *Plasmodium reichenowi* e informou que não foi encontrada literatura a respeito da patologia e sintomatologia desse parasita em chimpanzés.

Também são escassos trabalhos recentes sobre estudos de prevalência. Atualmente, a maior parte da literatura disponível nesse assunto trata sobre a utilização de primatas em estudos experimentais, seja com espécies de *Plasmodium* que infectam seres humanos ou com espécies de primatas do Velho Mundo em macacos de fácil utilização em experimentação.

Em orangotangos, existem dois trabalhos relativamente recentes relatando detecção de *Plasmodium* por análise molecular (reação em cadeia da polimerase – PCR). Na Indonésia, orangotangos (*Pongo pygmaeus*) semicativos de um centro de

cuidados foram avaliados. A positividade encontrada foi de 20,3% (14/69) em animais residentes do local, e de 57% (8/14) em animais recém chegados. Pelo sequenciamento dos produtos obtido e análises de filogenia, determinou-se que esses orangotangos estavam infectados com *Plasmodium pitheci* e *Plasmodium silvaticum*, sabidamente de orangotangos, além de *Plasmodium cynolmogi*, de macacos e *Plasmodium vivax*, de seres humanos (REID *et al.*, 2006). Na Malásia, encontro-se 24% de positividade para *Plasmodium* sp. em orangotangos (*Pongo pygmaeus pygmaeus*) de vida livre e 77% em de semicativeiro (KILBOURN *et al.*, 2003).

Em macacos do Velho Mundo, o único relato de prevalência disponível é um estudo em *Macaca fascicularis* do sul da Tailândia. Na microscopia, 5,1% (5/99) dos animais foram positivos. Pela PCR (gene *ssrRNA*), houve 6,1% (6/99) de positividade. Por análise filogenética, foi demonstrado *Plasmodium inui* em cinco animais e co-infecção com *Plasmodium coatneyi* em um animal (SEETHAMCHAI *et al.*, 2008).

Sobre macacos da América do Sul, existem trabalhos recentes no Brasil que relatam positividade para *Plasmodium* spp. em três regiões não endêmicas de malária do país (Mata Atlântica, Mata Atlântica semidecidual e Cerrado) por sorologia, PCR e microscopia. As técnicas utilizadas foram ELISA para detecção de anticorpos anti proteína do circumesporozoíto de *P. vivax*, *Plasmodium malariae*/*P. brasilianum* e *Plasmodium falciparum*; e reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos anti formas sanguíneas de *P. vivax*, *P. malariae* e *P. falciparum*. Os animais testados eram *Alouatta* sp., *Callithrix* sp. e *Cebus apella*. Nessas técnicas, os animais que apresentaram maior positividade foram *Alouatta*, em todas as regiões e nas duas técnicas, e *Cebus apella* da Mata Atlântica pela técnica de ELISA. A positividade relatada variou de 20% a 57,7% (no total de 777 animais), dependendo da região, técnica e espécie de primata (DUARTE *et al.*, 2006). Já na PCR, só os animais *Alouatta* sp. das regiões Mata Atlântica (total de 71 animais) e Mata Atlântica semidecidual (total de 235 animais) apresentaram positividade, sendo respectivamente de 5,6% e 0,4% para *P. vivax*/*P. simium*; 5,6% e 5,5% para *P. malariae*/*P. brasilianum* e 1,4% e 0,8% para *P. falciparum*. Na microscopia, apenas 3% dos *Alouatta* da Mata Atlântica semidecidual foram positivos, porém esses animais foram negativos na PCR, fato que os autores explicam lembrando que esses parasitas encontrados podem ser de espécies ainda

não identificadas (DUARTE *et al.*, 2008).

Na Guiana Francesa, De Thoisy *et al.* (2000) relataram um trabalho em animais capturados para translocação, nos quais foram realizados exames de microscopia para procura de hemoparasitas. Quatro das cinco espécies de primatas examinadas tinham exemplares positivos para *P. brasilianum*. Da família Callithricidae, 51% (43/84) dos exemplares de *Saguinus midas* foram positivos. Da família Cebidae, 16% (1/16) dos exemplares de *Saimiri sciurus*, 50% (3/6) dos *Pithecia pithecia*, e 16% (18/114) dos *Alouatta seniculus*. Também dessa última família, um único exemplar de *Ateles paniscus* foi capturado e foi negativo.

2.2.2 Uso como modelos experimentais

As espécies de *Plasmodium* que infectam símios são de grande interesse para estudos da malária. Esses parasitas possuem muitas características que os fazem particularmente adequados, como semelhanças biológicas com certos parasitas humanos, e por isso são muito utilizados como modelos experimentais. Além disso, essas espécies podem naturalmente infectar seres humanos (FANDEUR *et al.*, 2000; GALLAND, 2000; COLLINS *et al.*, 2006).

Apesar de grandes símios também serem utilizados, pela facilidade de manutenção e manipulação dos primatas menores, os macacos do Novo Mundo foram testados em vários estudos para verificar se eles se infectam com parasitas de outros primatas (GALLAND, 2000). Os macacos provaram ser muito úteis e são utilizados principalmente em pesquisas de avaliação de drogas antimaláricas e antígenos candidatos a alvo de vacinas, na investigação da resposta imune do hospedeiro e no estudo de alguns efeitos patogênicos (GYSIN, 1998).

Nos estudos em busca de candidatos a alvo de vacinas, esforços estão sendo feitos para adaptar malária de macacos do Velho Mundo em macacos do Novo Mundo. Um experimento com infecção por *Plasmodium shortti* em *Saimiri boliviensis* conseguiu demonstrar o ciclo completo da infecção, sendo, segundo os autores, uma fonte adicional para estudos imunológicos e de testes de vacina (SULLIVAN *et al.*, 2003). Já estudos da infecção desse hospedeiro por *P. simium* sugeriram que esta combinação hospedeiro-parasita pode ser um modelo adequado para testes de candidatos à vacina contra *P. vivax* (COLLINS *et al.*, 2005). A previsibilidade da resposta parasitológica frente ao desafio dos esporozoítos e trofozoítos sugere que

estudos imunológicos e de eficácia com esses parasitas não humanos pode ser útil em estudos iniciais de antígenos conservados (COLLINS *et al.*, 1994).

Vários trabalhos estudaram as alterações patológicas de espécies de *Plasmodium* experimentalmente infectando hospedeiros primatas em laboratório. Collins *et al.* (2006) defendem que o *Plasmodium fragile* é um importante modelo experimental. Essa espécie possui características que o faz adequado para muitos estudos biológicos de modelo para infecções e doença por *P. falciparum*, como sequestro vascular profundo dos eritrócitos infectados por estágios maduros de trofozoítos, alto parasitismo, e infectividade em macacos do Novo Mundo.

Também foram relatados estudos com infecção por *P. coatneyi*, que também produz patologia similar ao *P. falciparum* em *Macaca mullata*, em um estudo que descreveu o desenvolvimento de coagulação intravascular disseminada em um animal, uma complicação da malária grave (MORENO *et al.*, 2007).

Pesquisas com infecção por *Plasmodium knowlesi* em *Papio anubis* (babuíno) para estudos da relação parasita-hospedeiro demonstrou que esse modelo é adequado para estudo da patogênese da malária cerebral (OZWARA *et al.*, 2003).

2.2.3 A malária como zoonose

Estudos demonstram que existe transmissão de parasitas de malária de seres humanos para outros primatas e vice-versa. Esse fato era considerado raro, mas hoje acredita-se que não seja tão incomum assim, principalmente a infecção de seres humanos por uma espécie de parasita de macacos no sudeste da Ásia, o *P. knowlesi*, que tem recebido especial atenção, a ponto da comunidade médica conjecturar se esse parasita é uma quinta espécie de malária humana (MCCUTCHAN, 2008).

Quanto às espécies do Novo Mundo, o parasita de macacos *P. brasilianum* é considerado a mesma espécie que o parasita humano *P. malariae*, de acordo com similaridades moleculares (FANDEUR *et al.*, 2000). Da uma maneira semelhante, *P. simium* foi identificado como um subtipo do *P. vivax* do Velho Mundo circulando em macacos no Novo Mundo (LI *et al.*, 2001). Portanto, o mesmo parasita, transmitido pelo mesmo vetor e circulando em duas espécies de hospedeiro diferentes na mesma região, pode permitir transmissão interespecífica, pelo menos ocasionalmente (CERUTTI-JÚNIOR *et al.*, 2007).

Esse fato é considerado há tempos pelos pesquisadores, mesmo antes da biologia molecular ter comprovado as similaridades entre os parasitas. Em 1992, Deane, em sua detalhada revisão sobre malária em macacos no Brasil, afirmou que, apesar do achado da alta prevalência de macacos infectados, não havia relação com a malária símia e a humana nas regiões Sul e Sudeste, onde a humana foi erradicada. Porém, na região Amazônica, estudos sorológicos revelaram alta ocorrência de anticorpos *P. brasilianum*/*P. malariae* em índios locais, sugerindo a possibilidade de entre eles a malária ser zoonótica.

Também na Guiana Francesa, em um estudo de prevalência do *P. brasilianum* em macacos, foi demonstrado que esses animais podem ser importantes reservatórios de malária humana (DE THOISY *et al.*, 2000). Os resultados de um outro trabalho sustentam a ideia de que a transmissão de malária de primatas neotropicais para pessoas e vice-versa pode não ser um evento tão raro na floresta Amazônica (VOLNEY *et al.*, 2002).

A possibilidade de primatas não humanos se infectarem naturalmente por malárias humanas também já foi comprovada. Em avaliação de orangotangos na Indonésia, foram encontrados animais parasitados por *P. vivax* e *P. cynolmogi* (REID *et al.*, 2006), sugerindo que esses animais podem ser reservatórios de malária humana e de macacos. No Brasil, estudos recentes de sorologia e PCR de primatas das regiões Centroeste e Sudeste, foi sugerido um potencial como reservatório de *P. vivax* e *P. falciparum* em macacos (DUARTE *et al.*, 2006; DUARTE *et al.*, 2008).

No sudeste da Ásia, achados frequentes de infecção por *P. knowlesi* em seres humanos levou à definição dessa infecção como uma genuína doença emergente, que é resultado de um parasita já conhecido em um novo hospedeiro (POLLEY, 2005). Já em 2004, Fleck alertava que esse *Plasmodium* de macacos podia estar mais amplamente disseminada entre seres humanos do que previamente se pensava e podia estar representando uma nova linhagem de malária.

Segundo McCutchan (2008), desde 1930 infecções em seres humanos por *Plasmodium* de macacos têm sido estudadas sob condições controladas em laboratórios. Porém, até o relato de um grande foco na Malásia (SINGH *et al.*, 2004), acreditava-se que infecções adquiridas naturalmente por *P. knowlesi* em seres humanos eram raras. Nesse trabalho foram analisadas por PCR amostras de pacientes diagnosticados microscopicamente com malária de um hospital regional de um distrito da Malásia e mais da metade (57,7%, 120/208) foram positivas para *P.*

knowlesi, sendo que na microscopia tinham sido identificadas como *P. malariae*, *P. falciparum* ou *P. vivax* e nenhuma deu positivo para *P. malariae*. Enquanto *P. malariae* nunca causa infecção severa e multiplica-se a cada três dias, o *P. knowlesi* multiplica-se diariamente e é potencialmente perigoso. Nesse relato pioneiro de um grande número de infecções de seres humanos com um *Plasmodium* símio, foi levantada pela primeira vez a questão da existência de transmissão desse parasita entre seres humanos, se já tem ou virá a ter. Em 2008, Cox-Singh *et al.* demonstraram que o *P. knowlesi* não é tão raro quanto pensado antes e é amplamente distribuído na Malásia, podendo inclusive ser fatal. Foi encontrado 30,7% (312/1014) de positividade para *P. knowlesi* em amostras de pacientes com malária de vários locais do país, além de serem descritos quatro casos fatais.

Apesar dos estudos mais detalhados serem na Malásia, a distribuição dessa malária emergente pode ser ainda mais abrangente, pois existem relatos recentes nas Filipinas (LUCHAVEZ *et al.*, 2008), na Tailândia (JONGWUTIWES *et al.*, 2004) e em Cingapura (NG *et al.*, 2008).

2.3 ROEDORES

2.3.1 Histórico murino

A história da malária murina começou com a descoberta de esporozoítos nas glândulas salivares de mosquitos *Anopheles durenii millescampsii*, que alimentam-se basicamente em roedores, na floresta da província de Catanga, no antigo Congo Belga, agora República Democrática do Congo (VINCKE, 1946a,b¹ citado por LAUDAU e CHABAUD, 1994). Pouco tempo depois descobriu-se o hospedeiro vertebrado, *Grammomys surdaster* e, através de inoculações em ratos de laboratório, o parasita foi isolado e denominado *Plasmodium berghei* (VINCKE e LIPS, 1948).

A segunda espécie foi isolada do mesmo inseto vetor e denominado *Plasmodium vinckei* (RODHAIN, 1952). Em 1954, por inoculação do sangue de

¹ VINCKE, I. H. Note sur la biologie de *Anopheles durenii* Edw. **Annales de la Société Belge de de Médecine Tropicale**, v.26, p. 161-174, 1946a; VINCKE, I. H. Note sur la biologie de *anophèles* d'Elisabethville et environs. **Annales de la Société Belge de de Médecine Tropicale**, v.26, p. 385-481, 1946b.

vários roedores silvestres, Vincke demonstrou três hospedeiros naturais: *Grammomys surdaster*, *Praomys jacksoni* e *Legada bella*. Em 1965 foi descrito um novo roedor hospedeiro (*Thamnomys rutilans*), na República Centro Africana e uma nova espécie de parasita (*Plasmodium chabaudi*) (LANDAU, 1965; LANDAU e CHABAUD, 1965). Um ano depois, foi descrito um outro *Plasmodium* que acreditou-se ser uma subespécie do *P. berghei*, denominada de *P. berghei yoelii* (LANDAU e KILLICK-KENDRICK, 1966).

Trabalhos realizados posteriormente com caracterizações bioquímicas permitiram o reconhecimento de novas espécies e subespécies de *Plasmodium*. Assim, a subespécie descoberta em 1966 foi elevada a uma nova espécie, *Plasmodium yoelii*, constituída por três subespécies, *P. y. yoelii*, *P. y. killicki* e *P. y. nigeriensis* (KILLICK-KENDRICK, 1974). Quatro subespécies de *P. vinckei* (*P. vinckei vinckei*, *P. vinckei lentum*, *P. vinckei petteri* e *P. vinckei brucechwati*) e duas de *P. chabaudi* (*P. chabaudi chabaudi* e *P. chabaudi adamii*) foram demonstradas, por diferenças bioquímicas e/ou isoenzimáticas e distribuição geográfica (CARTER e WALLIKER, 1975, 1976).

Em 1975, Abd-el-Aziz *et al.* descreveram um parasita de rato de grama africano (*Arvichantis niloticus*) no alto Egito. Pela morfologia em esfregaço, determinou-se ser um nova espécie, denominada *Plasmodium aegyptensis*. Porém, em pesquisas posteriores não foi possível detectar mais animais parasitados e não existem mais informações disponíveis dessa espécie.

As espécies, subespécies, hospedeiros naturais e distribuição geográfica de *Plasmodium* infectando murídeos estão listados no QUADRO 3.

ESPÉCIE	SUBESPÉCIE	HOSPEDEIRO	LOCAL	REFERÊNCIA
<i>Plasmodium berghei</i>		<i>Grammomys surdaster</i>	Katanga (RDC)	VINCKE e LIPS, 1948
<i>Plasmodium vinckei</i>	<i>brucechwatti</i>	<i>Praomys tulbergi</i>	Nigéria	KILLICK-KENDRICK, 1975
	<i>lentum</i>	<i>Thamnomys rutilans</i>	Congo, Camarões	LANDAU <i>et al.</i> , 1970
	<i>petteri</i>	<i>Thamnomys rutilans</i>	RCA	CARTER e WALLIKER, 1975
	<i>vinckei</i>	<i>Grammomys surdaster</i>	Katanga (RDC)	RODHAIN, 1952
<i>Plasmodium chabaudi</i>	<i>adami</i>	<i>Thamnomys rutilans</i>	Congo	CARTER e WALLIKER, 1976
	<i>chabaudi</i>	<i>Thamnomys rutilans</i>	RCA, Camarões	LANDAU, 1965
<i>Plasmodium yoelii</i>	<i>yoelii</i>	<i>Thamnomys rutilans</i>	RCA, Camarões	LANDAU e KILLICK-KENDRICK, 1966
	<i>killicki</i>	<i>Thamnomys rutilans</i>	Congo	LANDAU <i>et al.</i> , 1986
	<i>nigeriensis</i>	<i>Thamnomys rutilans</i>	Nigéria	KILLICK-KENDRICK, 1973
<i>Plasmodium aegyptensis</i>		<i>Arvichanthus niloticus</i>	Alto Egito	ABD-EL-AZIZ <i>et al.</i> , 1975

QUADRO 3 - ESPÉCIES E SUBESPÉCIES DE *Plasmodium* DESCRITOS EM ROEDORES DA FAMÍLIA MURIDAE, SEUS HOSPEDEIROS NATURAIS E DISTRIBUIÇÕES GEOGRÁFICAS

FONTE: O autor (2008)

NOTA: RDC: República Democrática do Congo; RCA: República Centro Africana.

2.3.2 Uso como modelos experimentais

As quatro espécies que infectam naturalmente roedores murídeos africanos são comumente utilizadas em estudos de vários aspectos da malária em laboratório (PERKINS *et al.*, 2007). É inquestionável que esses modelos murinos são a primeira opção quando são necessárias evidências *in vivo* preliminares no estudo da eficiência de drogas antimaláricas, respostas a candidatos à vacina, adaptações do ciclo de vida frente a desafios de medicamentos ou vacinas (CARLTON *et al.*, 2002).

Essas espécies de *Plasmodium* de roedores reproduzem muitas das características biológicas das espécies de *Plasmodium* que infectam seres humanos. Vários dos procedimentos experimentais refinados para uso em *P. falciparum* foram inicialmente desenvolvidos em espécies murinas, sendo um exemplo marcante o estudo de transferências genéticas estáveis (VAN DIJK *et al.*, 1995). Existem também várias outras aplicações do uso dos modelos murinos, que são intensivamente utilizadas no complemento da pesquisa com *P. falciparum* (CARLTON *et al.*, 2002).

Atualmente, na era genômica, os benefícios da malária de roedores como modelo experimental foi estendido para o nível genômico (PERKINS *et al.*, 2007). Análises genômicas, transcriptômicas e proteômicas permitiram percepções sobre a evolução genômica, expressão de famílias multigenes e mecanismos de regulação pós transcricionais em *Plasmodium* de roedores, enfatizando o valor de modelos para o estudo de caracterizações ortólogas dos parasitas humanos. Nessas pesquisas, os parasitas de roedores *P. chabaudi*, *P. yoelii* e *P. berghei*, que são intimamente relacionados com o *P. falciparum* e *P. vivax* são comumente utilizados em laboratório (HALL *et al.*, 2005).

O genoma do parasita *P. yoelii yoelii* foi sequenciado parcialmente e foi demonstrado que, apesar de limitado na aplicação do estudo da estrutura genômica, é um meio efetivo da descoberta de genes e um estudo experimental eficiente em um modelo murino. É fato que existem divergências consideráveis entre os genomas do *P. yoelii yoelii* e do *P. falciparum*. Porém, o sequenciamento e as observações obtidas no estudo do primeiro podem substancialmente melhorar a acurácia e eficiência na obtenção de resultados de pesquisa do último (CARLTON *et al.*, 2002).

Recentemente, Perkins *et al.* (2007) realizaram um estudo de relações filogenéticas, com análise dos três genomas das espécies murinas de *Plasmodium* e

justificaram que a escolha dessas espécies para o trabalho foi por várias razões, como por elas serem de longe o grupo mais importante de modelo de parasitas nas últimas décadas. Esses pesquisadores enfatizaram a importância do estudo das relações filogenéticas dos parasitas cujos genomas se quer comparar e afirmaram que escolha dos caracteres utilizados para se fazer esses estudos é um passo vital nesse processo.

Outra forma de pesquisa gênica com modelos murinos é a utilização de técnicas de *knockout* de genes, que são amplamente utilizadas para o entendimento da função dos genes alvo dos genomas dos parasitas, vetores e hospedeiros. Estudos com ratos modificados geneticamente para a deleção de genes específicos podem confirmar ou sugerir o papel dos potenciais mediadores da malária, quando os resultados são apropriadamente interpretados e aplicados em estudos adicionais em ratos e pessoas. Esse tipo de pesquisa também oferece oportunidade para medir vários parâmetros da doença e níveis de proteínas expressadas que não poderiam ser mensuradas em seres humanos (HERNANDEZ-VALLADARES *et al.*, 2007).

Uma aplicação muito útil dessa técnica é o uso em estudos de imagem das interações hospedeiro-parasita na fase dérmica do ciclo de vida do *Plasmodium*, que ainda devem ser caracterizadas. Com a disponibilidade de uma variada coleção de ratos *knockout* ou ratos com fluorescência de linhagem celular específica, aliado com o crescente número de esporozoítos mutantes com defeitos distintos, a pesquisa por imagem promete ser altamente informativa nos níveis teciduais, celulares e moleculares (AMINO *et al.*, 2007).

Já na pesquisa da patologia causada pela infecção pelo *Plasmodium* no hospedeiro, as áreas de estudos são muito amplas e com variadas aplicações.

Sabe-se que as implicações clínicas da infecção em humanos são altamente variáveis, sendo que algumas pessoas podem hospedar o parasita e não demonstrar nenhum tipo de sintoma, enquanto outros pacientes vão à óbito rapidamente (TIMMS *et al.*, 2001).

A respeito disso, é certo que um dos fatores que influenciam a gravidade da doença é a dose do parasita inoculada, que afeta diretamente o grau de lesão causada por esses parasitas. Um experimento com diferentes doses inoculadas de *P. chabaudi* em ratos de laboratório comprovou esse fato e sugere que intervenções que possam reduzir a dose infectante terão um efeito imediato na severidade da doença (TIMMS *et al.*, 2001).

Quando há o desenvolvimento da doença, um quadro comum da malária humana é a ativação linfocitária policlonal associada à esplenomegalia, com hipergamaglobulinemia e produção de auto anticorpos e depressão imune. O baço desempenha um papel fundamental nesse quadro, estando envolvido em vários processos, como a remoção de eritrócitos danificados e parasitados da circulação, a produção de novos eritrócitos e desenvolvimento de respostas imune protetora e patológica (ENGWERDA *et al.*, 2005). Um trabalho de infecção experimental por *P. chabaudi*, que é um modelo murino com similaridades com o *P. falciparum*, contribuiu para o entendimento dos mecanismos de apresentação de antígeno e produção de anticorpos, que são essenciais para a aquisição de imunidade protetora contra malária (CASTILLO-MÉNDEZ *et al.*, 2007).

Na doença grave em seres humanos, uma questão preocupante é o aparecimento da malária cerebral, uma importante complicação com risco à vida e que afeta principalmente crianças de dois a seis anos na África e adultos do sudoeste da Ásia. Apesar de muitos anos de pesquisa intensiva, a patogênese dessa complicação ainda não foi esclarecida. Sobre vários aspectos, as evidências obtidas foram baseadas no uso de modelos roedores na malária cerebral, com experimentos utilizando infecções por *P. yoelii* e o *P. berghei*, que causam em ratos síndromes cerebrais que possuem numerosas similaridades com a condição humana (HUNT *et al.*, 2006).

Uma outra complicação que também merece atenção dos estudos experimentais é a transmissão do parasita pela via congênita. Devido a importância do desenvolvimento de estudo experimentais dessa condição, pesquisas têm sido direcionadas para se encontrar um modelo adequado para estudo dessa condição, sendo que resultados contraditórios foram relatados. Um estudo teve sucesso na transmissão congênita em um tipo de camundongos, demonstrando que o *Plasmodium berghei* nesses roedores de laboratório pode ser um bom modelo para o estudo da patogênese dessa doença (ADACHI *et al.*, 2000).

O *Plasmodium* infectando pessoas que vivem em áreas endêmicas de malária e helmintos pode desencadear um fato interessante da doença, que é a ocorrência de co-infecção com outra parasitose. Essas pessoas geralmente são infectadas pelos dois parasitas desde pouca idade e as reinfecções que ocorrem constantemente implicam na ocorrência, em algum momento de suas vidas, de co-infecções. As interações entre os parasitas na doença causada pelo *Plasmodium* juntamente com

helmintos têm sido descritas, incluindo aumento da prevalência e severidade do *P. falciparum* em pacientes com helmintos. Porém, o mecanismo que acarreta a este fato ainda não foi definido. Um modelo laboratorial de estudo dessa condição apresentou exarcebação da malária em ratos cronicamente infectados com *E. caproni*. Depois do tratamento do helminto, foi observada a reversão dessa exarcebação. Com isso, foi demonstrado que este pode ser um sistema atrativo de modelo experimental para estudos dessas interações entre parasitas e da resposta do hospedeiro à co-infecção (NOLAND *et al.*, 2005).

A evolução dos patógenos pode ser um obstáculo crucial no desenvolvimento de controles efetivos da doença em questão. Além do exemplo óbvio de resistência às drogas, existe o papel que a virulência do patógeno pode exercer. Na maioria das vezes, a evolução da virulência têm sido estudada com o uso de modelos, onde a direção da seleção atuando na transformação da virulência do parasita é modelada para um patamar ótimo. A disponibilidade de uma gama de clones de *P. chabaudi* e uma variedade de hospedeiros diferentes permitiu testar constatações implícitas na evolução da virulência e modelos teóricos coevolucionários em um animal clinicamente relevante (GRECH *et al.*, 2006).

Um outro experimento foi realizado para entender o limite da virulência dos parasitas, sendo infectados ratos de três genótipos diferentes com duas linhas de *P. chabaudi*, um com altas taxas de crescimento, virulência e transmissão; e a outra, uma linha ancestral com baixa virulência (MACKINNON *et al.*, 2002).

Gardner e Luciw (2008) defendem que a necessidade do desenvolvimento de medidas de proteção, incluindo vacinação, é imperativa, se for considerada a grande quantidade de pessoas infectadas por ano no mundo e alta mortalidade causada por malária. Os primeiros passos no desenvolvimento pré clínico de um protocolo de vacinação são a identificação de antígenos, caracterizações bioquímicas e biológicas e avaliação da eficácia em modelos animais. E em estudos da malária, experimentos em animais geralmente são realizados utilizando ortólogos pertinentes do *P. falciparum* que é a forma mais letal das malárias humanas, em modelos murinos (*P. yoelii* e *P. berghei*) e em macacos (*P. knowlesi*) (MAHAJAN *et al.*, 2005).

Na doença causada pela infecção por *Plasmodium*, é sabido que a clínica e os aspectos patológicos resultam diretamente da replicação do estágio assexuado do parasita. E o início desse ciclo, a invasão dos eritrócitos, é considerado o ponto fraco do ciclo biológico do *Plasmodium* (GAUR *et al.*, 2004). Por isso, o mecanismo

de invasão eritrocítica pelo parasita é um importante alvo potencial para a produção de vacinas e drogas formuladas para interferir nas interações ligante-receptor (O'DONNELL e BLACKMAN, 2005).

Estudos buscam esclarecer por exemplo, a existência de vias de invasão distintas, que pode explicar o porque dos esporozoítos de *P. berghei* serem capazes de infectar vários tipos de células *in vitro*. Esse mecanismo pode também ser uma maneira dos parasitas humanos escaparem da resposta imune e enfrentarem possíveis polimorfismos de receptores no hospedeiro. A elucidação dessa característica dos parasitas da malária pode gerar importantes implicações no desenvolvimento de alvos experimentais para vacinas (SILVIE *et al.*, 2007).

A pesquisa de antígenos alvo para vacinação tem buscado também informações sobre proteção cruzada nas respostas imunes. Pela importância que estudos murinos na busca de têm tido em fornecer bases para estudos humanos com esporozoítos atenuados, foi realizado um experimento utilizando dois tipos de parasitas de roedores, *P. berghei* e *P. yoelii* e foi demonstrada significativa proteção cruzada e que diferentes respostas imunes podem atuar contra parasitas intimamente relacionados. Esse achado é interessante mas não pode ser usado para afirmar o que vai ocorrer em seres humanos imunizados com esporozoítos atenuados por radiação. Porém, sugere-se que poderá ocorrer proteção cruzada com *P. vivax*. Análises comparativas dos genomas do *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. berghei* e *P. yoelii* podem propiciar mais informações sobre a probabilidade de proteção cruzada (SEDEGAH *et al.*, 2007).

2.4 OUTROS MAMÍFEROS

Existem alguns relatos de espécies de *Plasmodium* infectando outros mamíferos que não primatas ou roedores murinos. São conhecido como hospedeiros o porco espinho africano, morcegos, esquilos e ungulados. A grande maioria dos relatos são antigos e únicos, não se encontrando mais artigos sobre essas espécies descritas. No QUADRO 4 estão listadas as espécies de *Plasmodium* descritas em mamíferos não primatas e não roedores murinos. Existe também relatos de *Plasmodium* em musaranhos-elefantes *Elephantulus* sp. e *Petrodromus tetradactylus* (Macroscelidea:Macroscelididae), porém os artigos originais não estão disponíveis e não existem informações consistentes sobre essas espécies de malária (HEISH *et*

al., 1954; COATNEY *et al.*, 1960).

No porco espinho africano *Atherurus africanus* foi descrito o *Plasmodium atheruri*, na República Democrática do Congo (VAN DEN BERGH *et al.*, 1958¹, citado por LANDAU *et al.*, 1983). Foi demonstrado que a infecção no hospedeiro natural tem duas fases distintas, a infecção aguda e a crônica; e em roedores de laboratório só ocorre a aguda.

Em morcegos, a primeira descrição foi feita em *Rousettus leachi* (Megachiroptera:Pteropodidae) por Van Riel e Hiernaux-L'Hoëst em 1951² (citado por VAN DER KAA, 1964), sendo o parasita denominado *Plasmodium roussetti*. Em 1964, Van Der Kaay descreveu uma nova espécie em *Rousettus smithi*, capturados em cavernas em Gana, sendo o parasita denominado *Plasmodium voltaicum*. Nesse trabalho, foram demonstradas uma alta prevalência nos morcegos (24/25) e uma parasitemia sempre baixa. Existe também a descrição de um parasita de *Hipposideros cyclops* (Microchiroptera:Rhinolophidae) no Gabão, o *Plasmodium cyclopsi* (LANDAU e CHABAUD, 1978).

Em 1905, Laveran citado por Coatney *et al.* (1960) descreveu um parasita em esquilos de mão amarela (*Sciurus griseimanus*), o *Plasmodium vassali*. Depois, foi descrito o achado de *Plasmodium* em três espécies de esquilos na Tailândia (COATNEY *et al.*, 1960). Porém, não foi possível a classificação da espécie do parasita. Em 1965, foi relatado um parasita em esquilo grande voador da Malásia (*Petaurista petaurista melanotus*), denominado de *Plasmodium booliati* (SANDOSHAM *et al.*, 1965³ citado por LIEN e CROSS, 1968). Por fim, o último trabalho disponível de malária em esquilos é de 1968, em que foi relatado um *Plasmodium* de esquilo grande voador (*Petaurista petaurista grandis*) em Taiwan, denominado de *Plasmodium watteni* (LIEN e CROSS, 1968).

Os ungulados são hospedeiros não usuais de malária, porém algumas espécies foram descritas no Velho Mundo e uma no Novo Mundo, sendo essa última

¹ VAN DEN BERGH, L.; PEEL, E.; CHARDOME, M.; LAMBERCHT, F. L. Le cycle asexué de *Plasmodium atheruri* n. sp. du porc-épic *Atherurus africanus centralis* au Congo Belge. **Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale**, v.38, p.971-976, 1958.

² VAN RIEL, J.; HIERNAX-L'HOËST, D. Description of a plasmodium found in a bat, *Rousettus leachi*. **Parasitology**, v.41, p.270, 1951.

³ SANDOSHAM, A. A.; YAP, L. F.; OMAR, I. A malaria parasite, *Plasmodium* (Vinckeia) *booliati* sp. nov., from a Malayan giant flying squirrel. **Medical Journal of Malaysia**, v. 20, n. 1, p. 3-7, 1965.

a única espécie de *Plasmodium* descrita infectando mamíferos não primatas no Novo Mundo (GARNHAM e KUTTLER, 1980).

A descoberta de malária em ungulados começou com o relato de um parasita em dois indivíduos da espécie *Silvicapra grimmii* (bambi comum) em Malawi (sudeste da África), sendo que um deles apresentou uma infecção aguda com sinais clínicos (pelagem seca e sem brilho, nariz quente e seco) e o outro animal apresentava uma infecção crônica, sem manifestações clínicas. A espécie de *Plasmodium* era similar morfológicamente com *P. malariae* e suas características morfológicas na microscopia foram detalhadamente descritas, sendo então denominada *Plasmodium cephalophi* (BRUCE *et al.*, 1913).

Depois, em búfalos domésticos no norte da Índia, foi encontrado o *Plasmodium bubalis* (SHEATHER, 1919¹ citado por KEYMER, 1966). Só muitos anos depois, foram descritos parasitas em *Tragulus javanicus* (cervo-rato) da Malásia e do Sri Lanka, denominados de *Plasmodium traguli traguli* e *Plasmodium traguli meminna*, respectivamente (GARNHAM e EDESON, 1962²; DISSANAIKE, 1963³ citados por GARNHAM e KUTTLER, 1980).

Em 1966, Keymer descreveu a redescoberta de *P. cephalophi* em bambis-comuns em Malawi e no Zimbábue, constatando uma baixa parasitemia e baixa prevalência. Porém, o trabalho conseguiu comprovar a infecção natural de animais esplenectomizados expostos à vetores no habitat natural. Também nesse ano, foi descrito outra espécie de *Plasmodium* nesses antílopes, denominada *Plasmodium brucei* (GARNHAM, 1966⁴ citado por GARNHAM e KUTTLER, 1980).

O último relato de malária em ungulados data de 1967, quando Kuttler e colaboradores descobriram um parasita em um *Odocoileus virginianus* (cervo da cauda branca) esplenectomizado no Texas. Em 1980, foi relatada a descrição detalhada da morfologia desse parasita, que foi denominado *Plasmodium odocoilei* (GARNHAM e KUTTLER, 1980).

¹ SHEATHER, A. L. A malarial parasite in the blood of a buffalo. **Bulletin of Agriculture Research Institute Pusa**, n.90, 1919.

² GARNHAM, P. C. C.; EDESON, J. F. B. Two new malaria parasites of the Malayan mouse deer. **Rivista di Malariologia**, v. 41, p.3-10, 1962.

³ DISSANAIKE, A. S. On some blood parasites of wild animals in Ceylon. **Ceylon veterinary Journal**, v.11, p.73-86, 1963.

⁴ GARNHAM, P. C. C. **Malaria parasites and other Haemosporidia**. Oxford: Blackwell, 1966.

Após essa última descrição de malária em ungulado nos EUA, não foram encontrados mais trabalhos a respeito de *Plasmodium* em mamíferos silvestres não primatas e não murinos.

ESPÉCIE	HOSPEDEIRO	LOCAL
<i>Plasmodium atheruri</i>	<i>Atherurus africanus</i> (porco espinho africano)	República Democrática do Congo
<i>Plasmodium booliati</i>	<i>Petaurista p. melanotus</i> (esquilo gigante voador)	Malásia
<i>Plasmodium brodeni</i>	<i>Elephantulus</i> sp. (musaranhos-elefantes)	-
<i>Plasmodium brucei</i>	<i>Sylvicapra grimmia</i> (bambi comum)	África tropical
<i>Plasmodium bubalis</i>	<i>Bubalus bubalis</i> (búfalo)	norte da Índia
<i>Plasmodium cephalophi</i>	<i>Sylvicapra grimmia</i> (bambi comum)	Malawi e Zimbábue
<i>Plasmodium cyclops</i>	<i>Hipposideros cyclops</i> (morcego microquiróptero)	Gabão
<i>Plasmodium odocoilei</i>	<i>Odocoileus virginianus</i> (cervo da cauda branca)	Texas, EUA
<i>Plasmodium roussetti</i>	<i>Roussettus leachi</i> (morcego megaquiróptero)	-
<i>Plasmodium</i> sp.	esquilos	Tailândia
<i>Plasmodium traguli</i>	<i>Tragulus javanicus</i> (cervo rato)	Malásia e Sri Lanka
<i>Plasmodium vassali</i>	<i>Sciurus griseimanus</i> (esquilo da mão amarela)	-
<i>Plasmodium voltaicum</i>	<i>Roussettus smithi</i> (morcego)	Gana
<i>Plasmodium watteni</i>	<i>Petaurista p. grandis</i> (esquilo gigante voador)	Taiwan

QUADRO 4 - ESPÉCIES DE *Plasmodium* DESCRITOS EM MAMÍFEROS NÃO PRIMATAS E NÃO MURÍDEOS E SEUS RESPECTIVOS HOSPEDEIROS E LOCAIS DE DESCRIÇÃO

FONTE: O autor (2008)

NOTA: Referências no texto

2.5 CONCLUSÕES

A malária é uma doença de impacto mundial histórico e recente e a importância de estudos na busca de informações a respeito de tratamento ou prevenção é evidente. Os modelos animais, tanto roedores quanto primatas, comprovadamente tiveram e com certeza terão um crucial papel na realização desses trabalhos.

Além da função indispensável como modelos experimentais, a evidência da malária ser uma zoonose e o fato de animais silvestres poderem ser reservatórios de espécies de *Plasmodium* que infectam seres humanos nos faz concluir que estudos com primatas têm uma relevância inquestionável.

Porém, apesar da importância da doença mundialmente, dos esforços da comunidade científica e das ferramentas disponíveis atualmente para estudos, a malária em mamíferos é ainda carente de esclarecimentos, tanto na questão de espécies de *Plasmodium* e hospedeiros existentes quanto a respeito da patologia e doença nos hospedeiros já conhecidos. Com exceção dos animais infectados experimentalmente em laboratório, cujas condições de transmissão, curso da doença e grau de patologia ao hospedeiro são conhecidos, esses aspectos ainda são praticamente desconhecidos nos mamíferos não humanos.

Deste modo, estudos mais detalhados são ainda necessários para se definir as espécies de *Plamodium* existentes, seus respectivos hospedeiros silvestres e distribuição geográfica no mundo, assim como a importância e as consequências do parasitismo nesses animais.

REFERÊNCIAS

- ABD-EL-AZIZ, G. A.; LANDAU, I.; MILTGEN, F. Description of *Plasmodium aegyptensis* n. sp., presumed parasite of the Muridae *Arvicanthis nolticus* in Upper Egypt. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 50, n. 4, p. 419-424, 1975.
- ADACHI M, Y. M.; ANDO, K.; SAKURAI, M.; CHINZEI, Y. Scant parasitemia in BALB/c mice with congenital malaria infection. **The Journal of Parasitology**, v. 86, n. 5, p.1030-1034, 2000.
- AMINO, R.; THIBERGE, S.; BLAZQUEZ, S.; BALDACCI, P.; RENAUD, O.; SHORTE, S.; MÉNARD, R. Imaging malaria sporozoites in the dermis of the mammalian host. **Nature Protocols**, v. 2, n. 7, p. 1705-1712, 2007.
- BRUCE, D.; HARVEY, D.; HAMERTON, A. E.; BRUCE. *Plasmodium cephalophi*, sp. nov. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B**, v. 87, n. 592, p. 45-47, 1913.
- CARLTON, J. M.; ANGIUOLI, S. V.; SUH, B. B.; KOOIJ, T. W.; PERTEA, M.; SILVA, J. C.; ERMOLAEVA, M. D.; ALLEN, J. E.; SELENGUT, J. D.; KOO, H. L.; PETERSON, J. D.; POP, M.; KOSACK, D. S.; SHUMWAY, M. F.; BIDWELL, S. L.; SHALLOM, S. J.; VAN AKEN, S. E.; RIEDMULLER, S. B.; FELDBLYUM, T. V.; CHO, J. K.; QUACKENBUSH, J.; SEDEGAH, M.; SHOAIBI, A.; CUMMINGS, L. M.; FLORENS, L.; YATES, J. R.; RAINE, J. D.; SINDEN, R. E.; HARRIS, M. A.; CUNNINGHAM, D. A.; PREISER, P. R.; BERGMAN, L. W.; VAIDYA, A. B.; VAN LIN, L. H.; JANSE, C. J.; WATERS, A. P.; SMITH, H. O.; WHITE, O. R.; SALZBERG, S. L.; VENTER, J. C.; FRASER, C. M.; HOFFMAN, S. L.; GARDNER, M. J.; CARUCCI, D. J. Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. **Nature**, v. 419, n. 6906, p. 512-519, 2002.
- CARTER, R.; WALLIKER, D. New observations on the malaria parasites of rodents of the Central African Republic - *Plasmodium vinckei petteri* subsp. nov. and *Plasmodium chabaudi* Landau, 1965. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 69, n. 2, p. 187-196, 1975.
- CARTER, R.; WALLIKER, D. Malaria parasites of rodents of the Congo (Brazzaville): *Plasmodium chabaudi adami* subsp. nov. and *Plasmodium vinckei lentum* Landau, Michel, Adam and Boulard, 1976. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 51, n. 6, p. 637-646, 1976.
- CASTILLO-MÉNDEZ, S. I.; ZAGO, C. A.; SARDINHA, L. R.; FREITAS DO ROSÁRIO, A. P.; ALVAREZ, J. M.; D'IMPÉRIO LIMA, M. R. Characterization of the spleen B-cell compartment at the early and late blood-stage *Plasmodium chabaudi* malaria. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 66, n. 2-3, p. 309-319, 2007.
- CERUTTI-JÚNIOR, C.; BOULOS, M.; COUTINHO, A. F.; HATAB, M. C. L. D.; FALQUETI, A.; REZANDE, H. R.; DUARTE, A. M. R. C.; COLLINS, W.; MALAFRONTÉ, R. S. Epidemiologic aspects of the malaria transmission cycle in an

area of very low incidence in Brazil. **Malaria Journal**, v. 6, p. 33, 2007.

CHATTERJEE, S.; PERIGNON, J. L.; VAN MARCK, E.; DRUILHE, P. How reliable are models for malaria vaccine development? Lessons from irradiated sporozoite immunizations. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 52, n. 4, p. 321-4, 2006.

COATNEY, G. R.; ELBEL, R. E.; KOCHARATANA, P. Some blood parasites found in birds and mammals from Loei Province, Thailand. **The Journal of Parasitology**, v. 46, n. 6, p. 701-702, 1960.

COLLINS, W. E.; PYE, D.; CREWETHER, P. E.; VANDENBURG, K. L.; GALLAND, G. G.; SULZER, A. J.; KEMP, D. J.; EDWARDS, S. J.; COPPEL, R. L.; SULLIVAN, J. S.; MORRIS, C. L.; ANDERS, R. F. Protective immunity induced in squirrel monkeys with recombinant apical membrane antigen-1 of *Plasmodium fragile*. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 51, p. 711-719, 1994.

COLLINS, W. E.; SULLIVAN, J. S.; GALLAND, G. G.; WILLIAMS, A.; NACE, D.; WILLIAMS, T.; BARNWELL, J. W. *Plasmodium simium* and *Saimiri boliviensis* as a model system for testing candidate vaccines against *Plasmodium vivax*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 3, p. 644-648, 2005.

COLLINS, W. E.; SULLIVAN, J. S.; NACE, D.; WILLIAMS, T.; WILLIAMS, A.; BARNWELL, J. W. Observations on the sporozoite transmission of *Plasmodium vivax* to monkeys. **The Journal of Parasitology**, v. 94, n. 1, p. 287-288, 2008.

COLLINS, W. E.; WARREN, M.; SULLIVAN, J. S.; GALLAND, G. G.; STROBERT, E.; NACE, D.; WILLIAMS, A.; WILLIAMS, T.; BARNWELL, J. W. Studies on sporozoite-induced and chronic infections with *Plasmodium fragile* in *Macaca mulatta* and New World monkeys. **The Journal of Parasitology**, v. 92, n. 5, p. 1019-1026, 2006.

COX-SINGH, J.; SINGH, B. *Knowlesi* malaria: newly emergent and of public health importance? **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 9, p. 406-10, 2008.

DEANE, L. M. Simian malaria in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, Suppl 3, p. 1-20, 1992.

DE THOISY, B.; MICHEL, J. C.; VOGEL, I.; VIÉ, J. C. A survey of hemoparasite infections in free-ranging mammals and reptiles in French Guiana. **The Journal of Parasitology**, v. 86, n. 5, p. 1035-1040, 2000.

DUARTE, A. M.; MALAFRONT, R. DOS S.; CERUTTI, C. JR.; CURADO, I.; DE PAIVA, B. R.; MAEDA, A. Y.; YAMASAKI, T.; SUMMA, M. E.; NEVES, D. DO V.; DE OLIVEIRA, S. G.; GOMES, A. DE C. Natural *Plasmodium* infections in Brazilian wild monkeys: reservoirs for human infections? **Acta Tropica**, v. 107, n. 2, p. 179-185, 2008.

DUARTE, A. M.; PORTO, M. A.; CURADO, I.; MALAFRONT, R. S.; HOFFMANN, E. H.; DE OLIVEIRA, S. G.; DA SILVA, A. M.; KLOETZEL, J. K.; GOMES, A. DE C. Widespread occurrence of antibodies against circumsporozoite protein and against

blood forms of *Plasmodium vivax*, *P. falciparum* and *P. malariae* in Brazilian wild monkeys. **Journal of Medical Primatology**, v. 35, n. 2, p. 87-96, 2006.

EYLES, D. E. The species of simian malaria: taxonomy, morphology, life cycle, and geographical distribution of the monkey species. **The Journal of Parasitology**, v. 49, p. 866-887, 1963.

ENGWERDA, C.R.; BEATTIE, L.; AMANTE, F. H. The importance of the spleen in malaria. **Trends in Parasitology**, v. 21, p. 356–357, 2005.

FANDEUR, T.; VOLNEY, B.; PENEAU, C.; DE THOISY, B. Monkeys of the rainforest in French Guiana are natural reservoirs for *P. brasilianum*/*P. malariae* malaria. **Parasitology**, v. 120, n.1, p. 11-21, 2000.

FLECK, F. Monkey malaria could represent a new human strain. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 82, n. 5, p. 392-392, 2004.

GALLAND, G. G. Role of the squirrel monkey in parasitic disease research. **ILAR Journal**, v. 41, n. 1, 2000.

GARDNER M. B.; LUCIW P. A. Macaque models of human infectious disease. **ILAR Journal**, v. 49, n. 2, p. 220-255, 2008.

GARNHAM, P. C. C.; KUTTLER, K. L. A malaria parasite of the white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) and its relation with known species of *Plasmodium* in other ungulates. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 206, n. 1165, p. 395-402, 1980.

GAUR, D. D. C.; MAYER, G.; MILLER, L. H. Parasite ligand–host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. **International Journal of Parasitology**, v. 34, n. 13, p. 1413–1429, 2004.

GRECH, K.; WATT, K.; READ, A. F. Host-parasite interactions for virulence and resistance in a malaria model system. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 19, n. 5, p. 1620-1630, 2006.

GYSIN, J. Animal models: primates. In: SHERMAN, I. W (ed.). **Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis and Protection**. Washington, DC: ASM Press, 1998. p. 419–441.

HALL, N.; KARRAS, M.; RAINE, J. D.; CARLTON, J. M.; KOOIJ, T. W. A.; BERRIMAN, M.; FLORENS, L.; JANSSEN, C. S.; PAIN, A.; CHRISTOPHIDES, G. K.; JAMES, K.; RUTHERFORD, K.; HARRIS, B.; HARRIS, D.; CHURCHER, C.; QUAIL, M. A.; ORMOND, D.; DOGETT, J.; TRUEMAN, H. E.; MENDOZA, J.; BIDWELL, S. L.; RAJANDREAM, M. A.; CARUCCI, D. J.; YATES III, J. R.; KAFATOS, F. C.; JANSE, C. J.; BARRELL, B.; TURNER, C. M. R.; WATERS, A. P.; SINDEN, R. E. A comprehensive survey of the *Plasmodium* life cycle by genomic, transcriptomic, and proteomic analyses. **Science**, v. 307, p. 82-86, 2005.

HEISCH, R. B. Presence of *Plasmodium brodeni* in elephant shrews (*Elephantulu*

sp). **East African Medical Journal**, v. 31, n. 6, p.263-264, 1954.

HERNANDEZ-VALLADARES, M.; NAESSENS, J.; IRAQI, F. A. Gene-knockout mice in malaria research: useful or misleading? **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 11, p. 522-526, 2007.

HUNT, N. H.; GOLENSER, J.; CHAN-LING, T.; PAREKH, S.; RAE, C.; POTTER, S.; MEDANA, I. M.; MIU, J.; BALL, H. J. Immunopathogenesis of cerebral malaria. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 5, p. 569-582, 2006.

JONGWUTIWES, S.; PUTAPORNTIP, C.; IWASAKI, T.; SATA, T.; KANBARA, H. Naturally acquired *Plasmodium knowlesi* malaria in human, Thailand. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, p. 2211–2213, 2004.

KEYMER, I. F. Studies on *Plasmodium* (Vinckeia) *cephalophi* of the grey duiker (*Sylvicapra grimmia*). **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 60, n. 2, p. 129-138, 1966.

KILBOURN, A. M.; KARESH, W. B.; WOLFE, N. D.; BOSI, E. J.; COOK, R. A.; ANDAU, M. Health evaluation of free-ranging and semi-captive orangutans (*Pongo pygmaeus pygmaeus*) in Sabah, Malaysia. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 39, n. 1, p. 73-83, 2003.

KILLICK-KENDRICK, R. Parasitic protozoa of the blood of rodents I. The life-cycle and zoogeography of *Plasmodium berghei nigeriensis* subsp. nov. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 67, p. 261-277, 1973.

KILLICK-KENDRICK, R. Parasitic protozoa of the blood of rodents: a revision of *Plasmodium berghei*. **Parasitology**, v. 69, n. 2, p. 225-237, 1974.

KILLICK-KENDRICK, R. Parasitic protozoa of the blood of rodents V. *Plasmodium vinckei brucechwatti* subsp. nov. A malaria parasite of the thicket rat, *Thamnomys rutilans*, in Nigeria. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 50, p. 251-264, 1975.

LANDAU, I. Description de *Plasmodium chabaudi* n. sp., parasite de rongeurs africains. **Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences. Série D: Sciences naturelles**, v. 260, p. 3758-3761, 1965.

LANDAU I, CHABAUD A. G. Infection naturelle par deux *Plasmodium* du rongeur *Thamnomys rutilans* en République Centre Africaine. **Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences. Série D: Sciences naturelles**, v. 261, n. 1, p. 230-232, 1965.

LANDAU, I.; CHABAUD, A. G. Description of *P. cyclopsi* n. sp. a parasite of the microchiropteran bat *Hipposideros cyclops* in Gabon. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 53, n. 3, p. 247-253, 1978.

LANDAU I.; CHABAUD, A. G. *Plasmodium* species infecting *Thamnomys rutilans*: a zoological study. **Advances in Parasitology**, v. 33, p. 49-90, 1994.

LANDAU, I.; GAUTRET, P. Animal Models: Rodents. In: SHERMAN, I.W. **Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis and Protection**. Washington: ASM Press, 1998. p. 401-417.

LANDAU, I., KILLICK-KENDRICK, R. Rodent plasmodia of the République Centrafricaine: the sporogony and tissue stages of *Plasmodium chabaudi* and *P. berghei yoelii*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 5, p. 633-649, 1966.

LANDAU, I.; LEPERS, J. P.; RABETAFIKA, L.; BACCAM, D.; PETERS, W.; COULANGES, P. Plasmodia of lemurs in Madagascar. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 64, n. 3, p. 171-184, 1989.

LANDAU, I.; MICHEL, J. C.; ADAM, J. P. Cycle biologique au laboratoire de *Plasmodium berghe killicki* n. subsp. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 43, p. 545-550, 1968.

LANDAU, I.; MICHEL, J. C.; ADAM, J. P.; BOULARD, Y. The life cycle of *Plasmodium vinckei lentum* subsp. nov. in the laboratory: comments on the nomenclature of the murine malaria parasites. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 64, p. 315-323, 1970.

LANDAU, I.; MILTGEN, F.; BACCAM, D.; PETIT, G.; ROUSSILLON, C. Études sur *Plasmodium atheruri*. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 58, n. 6, p. 523-538, 1983.

LECLERC, M. C.; HUGOT, J. P.; DURAND, P.; RENAUD, F. Evolutionary relationships between 15 *Plasmodium* species from New and Old World primates (including humans): an 18S rDNA cladistic analysis. **Parasitology**, v. 129, n. 6, p. 677-684, 2004.

LEPERS, J. P.; RABETAFIKA, L.; LANDAU, I.; PETERS, W. A new *Plasmodium* species from a lemur: *Plasmodium coulangesi* n. sp. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 64, n. 3, p. 163-170, 1989.

LIEN, J. C.; CROSS, J. H. *Plasmodium* (Vinckeia) *watteni* sp. n. from the Formosan giant flying squirrel, *Petaurista petaurista grandis*. **The Journal of Parasitology**, v. 54, n. 6, p. 1171-1174, 1968.

LI, J.; COLLINS, W. E.; WIRTZ, R. A.; RATHORE, D.; LAL, A.; MCCUTCHAN, T. F. Geographic subdivision of the range of the malaria parasite *Plasmodium vivax*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 2, p. 35-42, 2001.

LUCHAVEZ, J.; ESPINO, F.; CURAMENG, P.; ESPINA, R.; BELL, D.; CHIODINI, P.; NOLDER, D.; SUTHERLAND, C.; LEE, K. S.; SINGH, B. Human Infections with *Plasmodium knowlesi*, the Philippines. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 5, p. 811-813, 2008.

MACKINNON, M. J.; GAFFNEY, D. J.; READ, A. F. Virulence in rodent malaria: host

genotype by parasite genotype interactions. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 1, n. 4, p. 287-296, 2002.

MAHAJAN, B.; JANI, D.; CHATTOPADHYAY, R.; NAGARKATTI, R.; ZHENG, H.; MAJAM, V.; WEISS, W.; KUMAR, S.; RATHORE, D. Identification, cloning, expression, and characterization of the gene for *Plasmodium knowlesi* surface protein containing an altered thrombospondin repeat domain. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 9, p. 5402-5409, 2005.

MCCUTCHAN, T. F. Is a monkey malaria from Borneo an emerging human disease? **Future Microbiology**, v. 3, p. 115-118, 2008.

MORENO, A.; GARCÍA, A.; CABRERA-MORA, M.; STROBERT, E.; GALINSKI, M. R. Disseminated intravascular coagulation complicated by peripheral gangrene in a rhesus macaque (*Macaca mulatta*) experimentally infected with *Plasmodium coatneyi*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 4, p. 648-654, 2007.

NG, O. T.; OOI, E. E.; LEE, C. C.; LEE, P. J.; NG, L. C.; WONG, P. S.; TU, T. M.; LOH, J. P.; LEO, Y. S. Naturally acquired human *Plasmodium knowlesi* infection, Singapore. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 5, p. 814-816, 2008.

NOLAND, G. S.; GRACZYK, T. K.; FRIED, B.; FITZGERALD, E. J.; KUMAR, N. Exacerbation of *Plasmodium yoelii* malaria in *Echinostoma caproni* infected mice and abatement through anthelmintic treatment. **The Journal of Parasitology**, v. 91, n. 4, p. 944-948, 2005.

O'DONNELL, R. A.; BLACKMAN, M.J. The role of malaria merozoites proteases in red blood cell invasion. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 422-427, 2005.

OZWARA, H.; LANGERMANS, J. A.; MAAMUN, J.; FARAH, I. O.; YOLE, D. S.; MWENDA, J. M.; WEILER, H.; THOMAS, A. W. Experimental infection of the olive baboon (*Papio anubis*) with *Plasmodium knowlesi*: severe disease accompanied by cerebral involvement. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, n. 2, p. 188-194, 2003.

PERKINS, S. L.; SARKAR, I. N.; CARTER, R. The phylogeny of rodent malaria parasites: Simultaneous analysis across three genomes. **Infections, Genetics and Evolution**, v. 7, n. 1, p. 74-83, 2007.

POLLEY, L. Navigating parasite webs and parasite flow: emerging and re-emerging parasitic zoonoses of wildlife origin. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 11-12, p. 1279-1294, 2005.

REID, M. J. C.; URSIC, R.; COOPER, D.; NAZZARI, H.; GRIFFITHS, M.; GALDIKAS, B. M.; GARRIGA, R. M.; SKINNER, M.; LOWENBERGER, C. Transmission of Human and Macaque *Plasmodium* spp. to Ex-Captive Orangutans in Kalimantan, Indonesia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 12, p. 1902- 1908, 2006.

RODHAIN, J. *Plasmodium vincke* n.sp. Un deuxième plasmodium parasite de

rongeurs sauvages au Katanga. **Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale (1920)**, v. 32, p. 275-280, 1952.

SEDEGAH, M.; WEISS, W. W.; HOFFMAN, S. L. Cross-protection between attenuated *Plasmodium berghei* and *P. yoelii* sporozoites. **Parasite Immunology**, v. 29, n. 11, p. 559-565, 2007.

SEETHAMCHAI, S.; PUTAPORNTIP, C.; MALAIVIJITNOND, S.; CUI, L.; JONGWUTIWES, S. Malaria and Hepatocystis Species in Wild Macaques, Southern Thailand. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 4, p. 646-653, 2008.

SILVIE, O.; FRANETICH, J. F.; BOUCHEIX, C.; RUBINSTEIN, E.; MAZIER, D. Alternative invasion pathways for *Plasmodium berghei* sporozoites. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 2, p. 173-182, 2007.

SINGH, B.; SUNG, L.K.; MATUSOP, A.; RADHAKRISHNAN, A.; SHAMSUL, S.S.G.; COX-SINGH, J.; THOMAS, A.; CONWAY, D.J. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. **The Lancet**, v. 363, n. 9414, p. 1017-1024, 2004.

SULLIVAN, J. S.; NACE, D.; WILLIAMS, T.; GUARNER, J.; NOLAND, G. S.; COLLINS, W. E. The development of exoerythrocytic stages of *Plasmodium inui shortti* in New World monkeys. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 3, p. 637-639, 2003.

TARELLO, W. A fatal *Plasmodium reichenowi* infection in a chimpanzee? **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 156, n. 10, p. 503-505, 2005.

TIMMS, R.; COLEGRAVE, N.; CHAN, B. H.; READ, A. F. The effect of parasite dose on disease severity in the rodent malaria *Plasmodium chabaudi*. **Parasitology**, v. 123, n. 1, p. 1-11, 2001.

VAN DER KAAY, H. J. Description of a new *Plasmodium*, *Plasmodium voltaicum* sp. nov., found in a fruit-bat, *Roussettus smithi*, in Ghana. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 58, p. 261-264, 1964.

VAN DIJK, M. R.; WATERS, A. P.; JANSE, C. J. Stable transfection of malaria parasite blood stages. **Science**, v. 268, p. 1358-1362, 1995.

VINCKE, I. H. Natural history of *Plasmodium berghei*. **Indian Journal of Malariology**, v. 8, p. 245-256, 1954.

VINCKE, I. H.; LIPS, M. Un nouveau plasmodium d'un rongeur sauvage du Congo, *Plasmodium berghei* n. sp. **Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale (1920)**, v. 28, p. 97-104, 1948.

VOLNEY, B.; POULIQUEN, J. F.; DE THOISY, B.; FANDEUR, T. A sero-epidemiological study of malaria in human and monkey populations in French Guiana. **Acta Tropica**, v. 82, n. 1, p. 11-23, 2002.

3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE *Plasmodium* spp.

RESUMO

A malária é a doença parasitária mais importante nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, por suas altas incidência e taxa de mortalidade e consiste em um desafio diagnóstico para laboratórios na maioria dos países com malária não endêmica. Atingir o nível mais alto possível de sensibilidade e especificidade é de maior importância, não só pelo diagnóstico precoce, mas também para a pesquisa de malária, como a validação de novos diagnósticos ou em estudos epidemiológicos. O objetivo desse estudo é revisar os principais métodos diagnóstico existentes hoje para o diagnóstico de *Plasmodium* spp. A microscopia ainda permanece como o padrão ouro para o diagnóstico laboratorial de malária, é barata e fácil de realizar, permite quantificação e, quando realizada por microscopista treinado, pode distinguir entre os diferentes estágios das quatro espécies de *Plasmodium* que causam malária em seres humanos, porém é demorada e de difícil detecção de infecções mistas. As técnicas de microscopia de fluorescência permitem mais rapidez no diagnóstico e maior sensibilidade, apesar do potencial de resultar em falsos positivos. A pesquisa de anticorpos da malária é utilizada em testes de triagem e estudos epidemiológicos e é realizada pela RIFI, o teste padrão, e pela ELISA, disponível em testes comerciais. Testes diagnósticos rápidos, que detectam antígenos circulantes por imunocromatografia, estão disponíveis em kits comerciais e representam uma alternativa mais simples ao diagnóstico. Métodos baseados na PCR têm sido demonstrado como sensíveis e específicos para o diagnóstico de malária e podem ser preferidos à microscopia como o teste padrão ouro para avaliação de novos testes diagnósticos. Possuem as vantagens de detectar baixas parasitemias, infecções mistas, diferenciam entre as espécies e permitem estudos genéticos. A tecnologia dos métodos para o diagnóstico da malária avança rapidamente, mas, provavelmente até o surgimento de novas técnicas que tragam vantagens significativas no diagnóstico em áreas endêmicas, o clássico exame de microscopia, aliado ao diagnóstico clínico, vai continuar prevalecendo.

Palavras-chave: Diagnóstico laboratorial. Malária. *Plasmodium*.

***Plasmodium* spp LABORATORY DIAGNOSIS**

ABSTRACT

Malaria is the most important parasitic disease on tropical and subtropical world regions, due to its high incidence and mortality rates and is a diagnostic challenge for laboratories of most of non endemic countries. Achieve the higher level of sensibility and specificity is of major importance, not only for early diagnosis, but also for malaria research, such as new diagnostic tests validation or epidemiological studies. The aim of this study is to review the major methods of *Plasmodium* spp. laboratorial diagnosis. Microscopy still the gold standard for the malaria laboratorial diagnosis and is cheap and easy to perform, allow quantification and, when performed by skilled microscopist, can distinguish between the different stages of the four species of human malaria, however is time consuming and hard to detect mixed infections. The fluorescent microscopy techniques allow fastest diagnosis and a higher sensibility, although the potential of false positives results. Malaria antibodies surveys are used for screening tests and epidemiological studies and are done through IFA, the gold standard and by ELISA, available in commercial kits. Rapid diagnostic tests, which detect circulating antigens by immunochromatography, are available in kits and represent a simpler alternative for diagnosis. PCR based methods are being demonstrated as sensitive and specific for malaria diagnosis and could be preferred as a standard to validation of new diagnostic techniques. They have the advantage of detect low parasitemia and mixed infections, perform species differentiation and permit genetical studies. The technologies of methods of diagnosis of malaria have a rapid development. But, probably until the advent of new techniques that show significant advantages on endemic areas diagnosis, the classic microscopy exam, together with clinical diagnosis, are still going to be prevalent.

Key words: Laboratory diagnosis. Malaria. *Plasmodium*.

3.1 INTRODUÇÃO

A malária é a doença parasitária mais importante nas regiões tropicais e subtropicais, por suas altas incidência e taxa de mortalidade (RODULFO *et al.*, 2007) e consiste em um desafio diagnóstico para laboratórios na maioria dos países não endêmicos (GATTI *et al.*, 2007).

A natureza não específica da apresentação clínica da malária pode resultar em tratamento excessivo em áreas endêmicas e a falta de diagnóstico em áreas de baixa transmissão. Assim, faz-se essencial o diagnóstico laboratorial preciso e precoce (RUBIO *et al.*, 2002; BHANDARI *et al.*, 2008). Além disso, o prognóstico e tratamento são diferentes, por isso é extremamente importante a rápida e correta identificação da espécie infectante (SWAN *et al.*, 2005).

Portanto, atingir o nível mais alto possível de sensibilidade e especificidade é de maior importância, não só pelo diagnóstico precoce, mas também na pesquisa de malária, como por exemplo para a validação de novos diagnósticos ou para estudos epidemiológicos (NOEDL *et al.*, 2006).

Um teste diagnóstico ideal para malária deve preencher vários requisitos antes de ser útil para uso em rotina. Deve ser simples, possível de ser realizado rapidamente, fácil de interpretar e fazer a diferenciação das espécies. O teste deve ser também possível de ser realizado em amostras frescas, conservadas secas ou congeladas. Deve poder ser formatado para instrumentos clínicos automatizados e ser quantitativo para permitir ao clínico acompanhar o progresso do tratamento. Finalmente, o teste deve ter custo acessível, para poder ser prontamente utilizado em áreas endêmicas. A disponibilidade de instrumentos diagnósticos rápidos, simples e específicos irá beneficiar o controle da malária, por permitir uma terapia acurada e eficiente (PIPER *et al.*, 1999).

O objetivo desse estudo é revisar os principais métodos diagnóstico existentes para o diagnóstico de *Plasmodium* spp. Os trabalhos encontrados para essa revisão são em sua maioria a respeito de espécies de *Plasmodium* que infectam os seres humanos. Porém, vários desses métodos podem ser aplicados, pelo menos em parte ou com modificações, para o diagnóstico de outras espécies do parasita.

3.2 MICROSCOPIA

3.2.1 Ótica

Consiste na técnica de observação direta do parasita ao microscópio ótico em esfregaço ou lâmina de gota espessa de sangue periférico, realizada após coloração com corante vital (BRAGA e FONTES, 2005). Esse método simples ainda permanece como o padrão ouro para o diagnóstico laboratorial de malária (ENDESHAW *et al.*, 2008).

É uma técnica barata e fácil de realizar, permite quantificação e, quando realizada por microscopista treinado, pode distinguir entre os diferentes estágios das quatro espécies de *Plasmodium* que causam malária em seres humanos (PERANDIN *et al.*, 2004).

Para o diagnóstico mais preciso, ambos esfregaço e gota espessa devem ser realizados. A lâmina de gota espessa concentra as camadas de células vermelhas em uma pequena superfície de 20 a 30 vezes. Esse tipo de lâmina fornece aumento de sensibilidade à microscopia e é muito melhor que o esfregaço para detecção de baixos níveis de parasitemia e reaparecimento de parasitas circulantes durante reincidência da infecção. O esfregaço confere facilidade na identificação das espécies dos parasitas, aumentando a especificidade (MOODY, 2002).

A quantificação dos parasitas podem ser realizadas nos dois tipos de lâminas, geralmente fazendo-se uma comparação com a quantidade de células sanguíneas nas lâminas. Um ponto fraco dessa estimativa quando feita em relação a quantidade de leucócitos é a determinação que todas as amostras contém um número fixo de leucócitos (MAKLER *et al.*, 1998).

O limite da sensibilidade é relatado como sendo de 500–1.000 parasitas por microlitro de sangue em esfregaços e de 5–10 em gota espessa (MYJAK *et al.*, 2002). Quando realizada em condições ótimas e por microscopista competente, pode-se detectar parasitemia de 10-40 parasitas por microlitro de sangue, mas é demorada e frequentemente difícil de identificar acuradamete infecções mistas (RUBIO *et al.*, 2002).

As principais desvantagens da microscopia são a difícil detecção de infecções mistas, pelas similaridades morfológicas entre estágios jovens dos parasitas da malária de diferentes espécies (NOEDL *et al.*, 2006). E o exame da gota espessa é

frequentemente difícil de ler e requer pessoal treinado (MAKLER *et al.*, 1998)

Além disso, em pacientes com *Plasmodium falciparum*, os parasitas podem ser sequestrados e não estarem presentes no sangue periférico. Portanto, uma infecção por esse parasita pode facilmente não ser diagnosticada pela ausência no esfregaço (PALMER *et al.*, 1998).

Existem relatos de tentativas de aprimoramento desse método clássico de diagnóstico. Recentemente, por exemplo, foi publicado um método de microscopia de *buffy coat*, obtido com a centrifugação de sangue em microtubos de hematócrito heparinizados, que coletam o sangue diretamente de uma punção digital. A técnica é denominada esfregaço de *buffy coat* centrifugado modificado e foi superior a microscopia tradicional, sendo fácil de realizar e de baixo custo (BHANDARI *et al.*, 2008).

3.2.2 Fluorescência

No intuito de melhorar a detecção de parasitas em lâminas de sangue, métodos alternativos foram desenvolvidos, como o método de coloração de lâminas de sangue periférico com fluorocromos, que se fixam no núcleo dos parasitas. Quando excitados por luz ultravioleta em um comprimento de onda apropriado, o núcleo fluoresce fortemente (MOODY, 2002).

Três técnicas desse tipo são promissoras e têm sido frequentemente usadas para o diagnóstico de malária: o *buffy coat* quantitativo, disponível em kit comercial (QBC; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ); o protocolo de laranja acridina (LA) de Kawamoto, e o processo de benzotiocarboxipurina. Essas técnicas são rápidas e relativamente fáceis de realizar e demonstram sensibilidade e especificidade equivalentes às aquelas alcançadas por microscopia (MAKLER *et al.*, 1998; MOODY, 2002).

Essas colorações com fluorocromos são mais facilmente realizadas por técnicos inexperientes e consomem menos tempo. Porém, possuem geralmente a desvantagem da necessidade de microscópios especiais de fluorescência. Uma exceção é o protocolo de Kawamoto, que desenvolveu um método com uso de coloração de LA, microscópio ótico e filtros de interferência especiais que permitiu rápida avaliação de lâminas de esfregaço e de gota espessa em aumento de 200x, sendo indicado como um método útil e econômico para o diagnóstico rápido de

malária (KAWAMOTO, 1991).

O método do *buffy coat* quantitativo (BQC) combina um tubo capilar com LA aderido e a separação das camadas de leucócitos e plaquetas pela centrifugação. Os parasitas se concentram abaixo dessa camada, aparecendo na camada superior dos eritrócitos mas também algumas vezes entre as camadas de plaquetas e leucócitos. Podem ser vistos através do tubo capilar usando uma objetiva especial de foco distante (paralentes) com um microscópio de fluorescência (MOODY, 2002). Considerando o alto custo e tendência a ter falsos positivos desse método, um estudo recente sugere que deve ser usado em casos suspeitos de malária com microscopia negativa uma ou mais vezes e deve ser empregado como teste final de diagnóstico e não como triagem (BHANDARI *et al.*, 2008).

Apesar de suas limitações, como exigência de treinamento, equipamentos e material caros, a microscopia de fluorescência no diagnóstico rápido de parasitas da malária é uma alternativa viável para a microscopia comum (MAKLER *et al.*, 1998).

3.3 TESTES IMUNOLÓGICOS

O uso de testes sorológicos para diagnóstico de malária foi iniciado na década de 60, sendo um grande avanço para a pesquisa diagnóstica. Os testes mais antigos como aglutinação de eritrócitos foram sendo substituídos por métodos mais aprimorados (BRUCE-CHWATT, 1987). Ainda hoje, os métodos mais comumente utilizados para detecção de anticorpos são a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), considerado o teste padrão, e o ELISA, e são aplicados principalmente em triagem em centros de transfusão, diagnóstico em pacientes com febre de origem desconhecida e esplenomegalia e em estudos epidemiológicos (DODERER *et al.*, 2007). Na prática clínica a sorologia não tem utilidade no diagnóstico da malária aguda, mas em algumas circunstâncias pode ser importante para diagnóstico retrospectivos (DRAPER e SIRR, 1980).

Essa limitação para a clínica se deve ao fato que resultados positivos vão ser obtidos apenas quando a resposta imune à infecção atingir um certo nível para a produção de anticorpos, o que ocorre de uma a duas semanas após infecção inicial e persiste por três a seis meses após o *clearance* dos parasitas (BRUCE-CHWATT, 1987; DODERER *et al.*, 2007)

Para um teste padrão de RIFI, anticorpos contra antígenos brutos de estágios

sanguíneos de *P. falciparum*, *Plasmodium vivax* e *Plasmodium malariae* são detectados por imunofluorescência em lâminas sanguíneas de monocamadas, preparadas com células infectadas de macacos *Saimiri* infectados experimentalmente com *P. falciparum* ou *P. vivax* ou com sangue de pacientes doentes com *P. malariae* (VOLNEY *et al.*, 2002).

A RIFI requer microscopia de fluorescência e técnicos treinados, tornando-se dependente de operadores e subjetiva, particularmente em amostras de soro com baixos títulos de anticorpo. A falta de padronização de reagentes e manipulações a faz impossível de harmonizar resultados entre laboratórios. Além disso, o antígeno é obtido em cultura *in vitro* de *P. falciparum* e confere uma ótima sensibilidade para essa espécie, mas mostra reatividade cruzada limitada com outras espécies infectantes aos seres humanos (DODERER *et al.*, 2007).

O teste clássico de ELISA é baseado na ligação de anticorpos anti-*Plasmodium* presentes na amostra de soro a antígenos imobilizados em placas. Os antígenos são uma mistura de uma extração total de uma cultura de *P. falciparum* e de antígenos recombinantes da proteína de superfície do merozoíto (MSP-1) e CSP de *P. vivax*. O teste não distingue entre IgG e IgM, ou entre anticorpos contra *P. falciparum*, *P. vivax*, *Plasmodium ovale* ou *P. malariae* (OH *et al.*, 2008).

Um kit que combina antígenos solúveis de *P. falciparum* com antígenos recombinantes de *P. vivax* e detecta IgG e IgM (ELISA malaria antibody test, DiaMed, Switzerland) foi testado e mostrou boa correlação com a RIFI. Pode ser um interessante método para substituir a RIFI especialmente em bancos de sangue, porém investigações mais extensivas devem ser realizadas para exame da performance analítica da técnica (DODERER *et al.*, 2007).

Uma pesquisa testando esse kit na Coreia demonstrou que, apesar dele ser sensível e específico pra *P. falciparum*, não é aplicável para detectar anticorpos contra *P. vivax*. Portanto, sugere que métodos devem ser melhorados para o rastreio de *P. vivax* em bancos de sangue (OH *et al.*, 2008).

Outro kit de ELISA (Malaria Ag CELISA, Cellabs) é baseado na detecção de proteína rica em histidina 2 (HRP-2), um marcador altamente sensível de *P. falciparum*, em amostra sanguíneas. A sensibilidade foi de 98,8% e a especificidade de 100%. Mesmo baixas parasitemias foram detectadas. Comparada com a PCR, a detecção foi mais rápida e barata. Porém, a disponibilidade de kits apenas para *P. falciparum* ainda limita as opções diagnósticas (NOEDL *et al.*, 2006).

Amostras sanguíneas coletadas em papéis filtro são uma boa alternativa para obtenção de soro ou plasma para estudos sorológicos, particularmente em locais com facilidades laboratoriais limitadas. Esse método é ainda mais interessante quando em estudos a campo de malária já utilizam frequentemente essa técnica para coleta de amostra para a realização de testes rápidos ou para provas baseadas em PCR. Foi demonstrada a utilidade da coleta de sangue com esse método para estimativa sorológica de endemicidade da malária e esses resultados concordaram com dados entomológicos (CORRAN *et al.*, 2008).

3.4 TESTES IMUNOCROMATOGRÁFICOS

Nos anos recentes, uma variedade de testes diagnósticos rápidos foram desenvolvidos para o diagnóstico da malária, baseados no reconhecimento de antígenos do parasita na circulação sanguínea (MENS *et al.*, 2007). A aplicação desses testes pode ser um significativo passo adiante na detecção de casos, manejo e redução de tratamentos desnecessários (ENDESHAW *et al.*, 2008).

Esses testes são comercialmente disponíveis como kits, que incluem todos os reagentes necessários e não requerem treinamento extensivo ou equipamentos para realizar o teste ou interpretar os resultados (MAKLER *et al.*, 1998). Porém, podem variar na velocidade e simplicidade de metodologia, clareza e força do sinal, apresentação, sensibilidade e especificidade, e necessidade de ser avaliado separadamente antes de implementação em larga escala (CRAIG *et al.*, 2002).

O princípio desses métodos, a imunocromatografia, consiste na migração de um líquido através da superfície de uma membrana de nitrocelulose. É feita a captura do antígeno do parasita do sangue periférico com uso de anticorpos monoclonais preparados conjugados com lipossomo ligado a selênio ou partículas de ouro numa fase móvel. Um segundo ou terceiro anticorpo monoclonal de captura aplicado a uma tira de nitrocelulose age como a fase imóvel. A migração do complexo antígeno-anticorpo na fase móvel ao longo da fita permite ao antígeno marcado ser capturado pelo anticorpo monoclonal na fase imóvel, produzindo então uma linha de cor visível (MOODY, 2002).

Os mais utilizados baseiam-se na detecção de HRP-2, aldolase ou lactato desidrogenase (LDH), com o uso de imunoglobulinas G ou M monoclonais (RODULFO *et al.*, 2007). A aldolase (que distingue não-*P. falciparum* de infecções

mistas) e outros específicos para *P. vivax* estão em início de desenvolvimento ou uso. A distinção entre os testes baseados em HRP-2 e LDH é que a HRP-2 pode permanecer na corrente sanguínea por dias ou semanas após o tratamento, enquanto a LDH só é detectável se parasitas vivos estiverem presentes (ENDESHAW *et al.*, 2008).

3.5 MÉTODOS BASEADOS EM REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Métodos baseados na PCR têm sido demonstrados como sensíveis e específicos para o diagnóstico de malária e podem ser preferidos frente à microscopia como o teste padrão ouro para avaliação de novos testes diagnósticos (CICERON *et al.*, 1999).

Nesse tipo de técnica, dois *primers* de oligonucleotídeos, que flanqueiam com uma sequência alvo do *Plasmodium* e Taq polimerase são usados em sucessivos ciclos de desnaturação e extensão do DNA para gerar bilhões de cópias da sequência alvo. A sequência alvo amplificada é então detectada por sondas internas ou analisadas em gel de eletroforese (MAKLER *et al.*, 1998).

As técnicas de amplificação e/ou detecção de material genético do *Plasmodium* são diversas, podendo ser gênero ou espécie-específicas. O uso do gene que codifica o RNA da subunidade menor ribossomal (*ssrRNA*) como alvo é um exemplo importante, sendo que existem várias técnicas e protocolos descritos (por ex.: SNOUNOU *et al.*, 1993, KIMURA *et al.*, 1997; ANDRADE, 2005), devendo também se citada a técnica de amplificação do gene mitocondrial codificador do citocromo b (por ex.: PERKINS e SCHALL, 2002).

A maior vantagem das técnicas moleculares é a habilidade de detectar infecção em pacientes com baixa parasitemia. E serem particularmente úteis em estudos de diferenças de linhagens, mutações e genes envolvidos em resistência à drogas nos parasitas e para mostrar o nível de relação em linhagens associadas com diferentes surtos de malária (MAKLER *et al.*, 1998). Métodos baseados em detecção de DNA foram descritos para uso na detecção de parasitas em hospedeiros e vetores, identificação de espécies de vetores e genotipagem dos parasitas e constituem uma importante ferramenta de pesquisa (SINGH, 1997).

Apesar de que a implementação de ferramentas moleculares no diagnóstico da malária pode ser difícil, a possibilidade de um sistema de detecção fácil e barato

as fazem técnicas promissoras no futuro próximo. Em áreas onde a incidência é baixa, o impacto de diagnósticos moleculares é muito maior do que em áreas de alta incidência de malária (MENS *et al.*, 2007).

Testes de sensibilidade demonstraram que a PCR detecta DNA de *Plasmodium* correspondente a 1,35–0,38 e 0,12 parasitas por microlitro de sangue para *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax*, respectivamente. E foi demonstrado que a maioria de 19 pacientes tratados ficaram negativos para DNA de *Plasmodium* 1–4 dias após o desaparecimento da parasitemia determinada por microscopia. Apenas em três casos a detecção foi por mais tempo (8–10 dias). Em conclusão, o método descrito demonstrou ser útil como referência, uma ferramenta importante em países com poucos casos diagnosticados por ano, principalmente em viajantes. Interações entre os centros de referência e laboratórios de hospitais são importantes para controle de qualidade e para a educação de técnicos (MYJAK *et al.*, 2002).

Como desvantagem, a utilidade da PCR é limitada pela complexa metodologia e exigência de técnicos especializados (SWAN *et al.*, 2005). Além de ser um método pouco prático para diagnóstico de urgência o que limita seu uso a países não endêmicos e exigir pessoal especializado para execução da técnica e interpretação dos resultados (MONTROYA *et al.*, 2008).

3.5.1 PCR em tempo real

As vantagens da PCR em tempo real em termos de confiabilidade, limitação de contaminação por DNA e não requerer manipulação pós amplificação, promoveu o seu uso para o diagnóstico de malária. Esse método deve ser de grande interesse para uso em viajantes que retornam de áreas endêmicas infectados com baixa parasitemia, em pacientes receptores de transfusão de sangue ou transplantes (DE MONBRISON *et al.*, 2003).

Essas técnicas têm o potencial de detectar baixos níveis de parasitemia, identificar infecções mistas e permitirem a diferenciação precisa das espécies por análise da curva de *melting* em uma única reação (MANGOLD *et al.*, 2005). Os resultados são obtidos rapidamente, o tempo de manuseio é reduzido e os riscos de contaminação são minimizados (PERANDIN *et al.*, 2004).

Porém, apesar de sua alta eficiência, é importante saber que esse método

não deve substituir as ferramentas diagnósticas convencionais rápidas e de baixo custo utilizados nas rotinas laboratoriais, mas ser direcionado a situações mais especializadas como testes de novas vacinas ou drogas, centros de transplantes ou bancos de sangue em áreas endêmicas. Esse método quantitativo pode também fornecer informações sobre a carga parasitária durante avaliação terapêutica de novas drogas ou na perspectiva de testes clínicos de vacinas (DE MONBRISON *et al.*, 2003).

3.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A preocupação da comunidade científica para a implementação de técnicas mais sensíveis e específicas, para diagnóstico da malária rápido e eficiente e com custo acessível é evidente. A acessibilidade desses testes a países onde a malária é endêmica é um fator indispensável para o sucesso de um novo diagnóstico a ser implementado. As exigências para um método diagnóstico se tornar um padrão mais eficiente não são somente alta sensibilidade e especificidade, eles devem ser facilmente aplicáveis onde o acesso à tecnologia é limitada e a necessidade de tratamento é urgente.

A tecnologia dos métodos para o diagnóstico da malária avança rapidamente, mas, provavelmente até o surgimento de novas técnicas que tragam vantagens significativas no diagnóstico em áreas endêmicas, o clássico exame de microscopia, aliado ao diagnóstico clínico, vai continuar prevalecendo, enquanto os métodos mais elaborados, com acurácia elevada, são utilizados em pesquisas nos locais onde há disponibilidade de pessoal treinado e aquisição de equipamento e material adequados.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, S. L. **Aspectos Epidemiológicos da Malária no Parque Nacional do Jaú, Amazonas, Brasil**. 287p. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) - Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, 2005.
- BHANDARI, P. L.; RAGHUVeer, C. V.; RAJEEV, A.; BHANDARI, P. D. Comparative study of peripheral blood smear, quantitative buffy coat and modified centrifuged blood smear in malaria diagnosis. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 108-112, 2008.
- BRAGA, E. M.; FONTES, C. J. F. *Plasmodium* – Malária. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**, 11^a ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 143-161.
- BRUCE-CHWATT, L. J. From Laveran's discovery to DNA probes: new trends in diagnosis of malaria. **Lancet**, v. 2, n. 8574, p. 1509-1511, 1987.
- CICERON, L.; JAUREGUIBERRY, G.; GAY, F.; DANIS, M. Development of a *Plasmodium* PCR for Monitoring Efficacy of Antimalarial Treatment. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 35–38, 1999.
- CORRAN, P. H.; COOK, J.; LYNCH, C.; LEENDERTSE, H.; MANJURANO, A.; GRIFFIN, J.; COX, J.; ABEKU, T.; BOUSEMA, T.; GHANI, A.C.; DRAKELEY, C.; RILEY, E. Dried blood spots as a source of anti-malarial antibodies for epidemiological studies. **Malaria Journal**, v. 7, p. 195, 2008.
- CRAIG, M. H.; BREDENKAMP, B. L.; VAUGHAN WILLIAMS, C. H.; ROSSOUW, E. J.; KELLY, V. J.; KLEINSCHMIDT, I.; MARTINEAU, A.; HENRY, G. F. J.. Field and laboratory comparative evaluation of ten rapid malaria diagnostic tests. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, p. 258-265, 2002.
- DE MONBRISON, F.; ANGEI, C.; STAAL, A.; KAISER, K.; PICOT, S. Simultaneous identification of the four human *Plasmodium* species and quantification of *Plasmodium* DNA load in human blood by real-time polymerase chain reaction. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, p. 387-390, 2003.
- DODERER, C.; HESCHUNG, A.; GUNTZ, F.; CAZENAVE, J.P.; HANSMANN, Y.; SENEGAS, A.; PFAFF, A.W.; ABDELRAHMAN, T.; CANDOLFI, E. A new ELISA kit which uses a combination of *Plasmodium falciparum* extract and recombinant *Plasmodium vivax* antigens as an alternative to IFAT for detection of malaria antibodies. **Malaria Journal**, v. 6, p. 19, 2007.
- DRAPER, C. C.; SIRR, S. S. Serological investigations in retrospective diagnosis of malaria. **British Medical Journal**, v. 280, n. 6231, p. 1575-1576, 1980.
- ENDESHAW, T.; GEBRE, T.; NGONDI, J.; GRAVES, P. M.; SHARGIE, E. B.; EJIGSEMAHU, Y.; AYELE, B.; YOHANNES, G.; TEFERI, T.; MESSELE, A.; ZERIHUN, M.; GENET, A.; MOSHER, A. W.; EMERSON, P. M.; RICHARDS, F. O.

Evaluation of light microscopy and rapid diagnostic test for the detection of malaria under operational field conditions: a household survey in Ethiopia. **Malaria Journal**, v. 7, p. 118, 2008.

GATTI, S.; GRAMEGNA, M.; BISOFFI, Z.; RAGLIO, A.; GULLETTA, M.; KLERSY, C.; BRUNO, A.; MASERATI, R.; MADAMA, S.; SCAGLIA, M.; GISPI STUDY GROUP. A comparison of three diagnostic techniques for malaria: a rapid diagnostic test (NOW Malaria), PCR and microscopy. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 101, n. 3, p. 195-204, 2007.

KAWAMOTO, F. Rapid diagnosis of malaria by fluorescence microscopy with light microscope and interference filter. **Lancet**, v. 337, n. 8735, p. 200-202, 1991.

KIMURA, M.; KNEKO, O.; LIU, Q. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. **Parasitology International**, v. 46, p. 89-95, 1997.

MAKLER, M. T.; PALMER, C. J.; AGER, A. L. A review of practical techniques for the diagnosis of malaria. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 92, n. 4, p. 419-433, 1998.

MANGOLD, K. A.; MANSON, R. U.; KOAY, E. S. C.; STEPHENS, L.; REGNER, M.; THOMSON JR., R. B.; PETERSON, L. R.; KAUL, K. L. Real-Time PCR for Detection and Identification of *Plasmodium* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2435-2440, 2005.

MENS, P.; SPIEKER, N.; OMAR, S.; HEIJNEN, M.; SCHALLIG, H.; KAGER, P. A. Is molecular biology the best alternative for diagnosis of malaria to microscopy? A comparison between microscopy, antigen detection and molecular tests in rural Kenya and urban Tanzania. **Tropical Medicine and International Health**, v. 12, n. 2, p. 238-244, 2007.

MONTOYA, A. E.; MENCO, J.; OSORIO, N.; ZULUAGA, M. A.; DUQUE, J.; TORRES, G.; RESTREPO, M. Concordancia entre gota gruesa, Inmunocromatografía y reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de malaria. **Biomédica**, v. 28, p. 252-261, 2008.

MOODY, A. Rapid Diagnostic Tests for malaria parasites. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 1, p. 66-78, 2002.

MYJAK, P.; NAHORSKI, W.; PIENIAZEK, N.J.; PIETKIEWICZ, H.. Usefulness of PCR for Diagnosis of imported malaria in Poland. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 21, p. 215-218, 2002.

NOEDL, H.; YINGYUEN, K.; LAOBOONCHAI, A.; FUKUDA, M.; SIRICHAISINTHOP, J.; MILLER, R. S. Sensitivity and specificity of an antigen detection ELISA for malaria diagnosis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 6, p. 1205-1208, 2006.

OH, J. S.; KIM, J. S.; LEE, C. H.; NAM, D. H.; KIM, S. H.; PARK, D. W.; LEE, C. K.; LIM, C. S.; PARK, G. H. Evaluation of a malaria antibody enzyme immunoassay for use in blood screening. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 1, p. 75-78, 2008.

PALMER, C. J.; LINDO, J. F.; KLASKALA, W. I.; QUESADA, J. A.; KAMINSKY, R.; BAUM, M. K.; AGER, A. L. Evaluation of the OptiMAL Test for Rapid Diagnosis of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* Malaria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 203–206, 1998.

PERANDIN, F.; MANCA, N.; CALDERARO, A.; PICCOLO, G.; GALATI, L.; RICCI, L.; MEDICI, M. C.; ARCANGELETTI, M. C.; SNOUNOU, G.; DETTORI, G.; CHEZZI, C. Development of a Real-Time PCR assay for detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for routine clinical diagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1214–1219, 2004.

PERKINS, S. L.; SCHALL, J. J. A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome *b* gene sequences. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 5, p. 972-978, 2002.

PIPER, R.; LEBRAS, J.; WENTWORTH, L.; HUNT-COOKE, A.; HOUZE, S.; CHIODINI, P.; MAKLER, M. Immunocapture diagnostic assays for malaria using *Plasmodium* Lactate dehydrogenase (pLDH). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n.1, p. 109–118, 1999.

RODULFO, H.; DE DONATO, M.; MORA, R.; GONZÁLEZ, L.; CONTRERAS, C. E. Comparison of the diagnosis of malaria by microscopy, immunochromatography and PCR in endemic areas of Venezuela. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 4, p. 535-543, 2007.

RUBIO, J. M.; POST, R. J.; DOCTERS VAN LEEUWEN, W. M.; HENRY, M. C.; LINDERGARD, G.; HOMMEL, M. Alternative polymerase chain reaction method to identify *Plasmodium* species in human blood samples: the semi-nested multiplex malaria PCR (SnM-PCR). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, s. 1, p. S1/199- S1/204, 2002.

SINGH, B. Molecular Methods for diagnosis and Epidemiological studies of Parasitic Infections. **International Journal of Parasitology**, v. 27, n. 10, p. 1135-1145, 1997.

SNOUNOU, G.; VIRIYAKOSOL S.; JARRA, W.; THAITHONG, S.; BROWN, K. N. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 58, p. 283-289, 1993.

SWAN, H.; SLOAN, L.; MUYOMBWE, A.; CHAVALITSHEWINKOON-PETMITR, P.; KRUDSOOD, S.; LEOWATTANA, W.; WILAIRATANA, P.; LOOAREESUWAN, S.; ROSENBLATT, J. Evaluation of a Real-Time Polymerase Chain Reaction assay for the diagnosis of malaria in patients from Thailand. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 5, p. 850–854, 2005.

VOLNEY, B.; POULIQUEN, J. F.; DE THOISY, B.; FANDEUR, T. A sero-epidemiological study of malaria in human and monkey populations in French Guiana. **Acta Tropica**, v. 82, n. 1, p. 11-23, 2002.

4 DETECÇÃO DE *Plasmodium* sp. EM CAPIVARAS DE VIDA LIVRE E DE CATIVEIRO DO REFÚGIO BIOLÓGICO BELA VISTA – ITAIPU BINACIONAL, FOZ DO IGUAÇU, PARANÁ

RESUMO

A malária em mamíferos ainda é pouco conhecida e existe uma grande necessidade de mais informações a respeito de outros hospedeiros e da doença nesses animais. A capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) é o maior roedor do mundo e habita ambientes semiaquáticos nas Américas Central e do Sul, e não existem relatos dela como hospedeiro de *Plasmodium* sp. Em março de 2007, foi encontrada uma inclusão intra-eritrocitária semelhante a um trofozoíto de *Plasmodium* sp em uma capivara de vida livre em Itaipu, que foi o estímulo para a realização desse trabalho, que descrever a pesquisa de *Plasmodium* sp. em amostras de sangue de capivaras de cativeiro e de vida livre por microscopia ótica e do respectivo DNA pela PCR. Para tanto, foram coletadas amostras de sangue total de 33 capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*), de cativeiro e de vida livre do RBV, entre agosto de 2007 e agosto de 2008. No total de animais avaliados pelo exame de microscopia (31), apenas um apresentou parasitemia detectada (3,2%). Pela PCR, do total de 33 amostras avaliadas, três foram detectadas como positivas para *Plasmodium* sp., incluindo o animal positivo pela microscopia. Pelo sequenciamento, houve 73,8% de similaridade com espécies infectantes de primatas, incluindo o homem; 73% com espécies de roedores; 75% com espécies de aves e 77,2% com espécies infectantes de lagarto. A maior similaridade encontrada (78,57 e 77,98%) foi com o *P. mexicanum*, de lagarto. Deste modo, concluiu-se que a capivara é um hospedeiro susceptível à infecção por *Plasmodium* sp. A parasitemia e a ocorrência encontradas na população de capivaras estudadas foram baixas. A PCR foi mais sensível na detecção do protozoário do que a microscopia. A infecção pelo *Plasmodium* sp. nas capivaras não causou alterações hematológicas verificadas pelo hemograma.

Palavras-chave: Diagnóstico. *Plasmodium*. Capivaras.

***Plasmodium* sp. DETECTION IN WILD AND CAPTIVE CAPYBARAS FROM THE BELA VISTA BIOLOGICAL SANCTUARY – ITAIPU BINATIONAL, FOZ DO IGUAÇU, PARANÁ**

ABSTRACT

Malaria in mammals still little known and there are a great need of information about hosts and the disease in these animals. Capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) is the largest rodent on earth and lives in semi aquatic habitat in South and Central America, and there are no reports of this animal as *Plasmodium* sp. host. On March 2007 it was found an intra erithocytic inclusion similar to a *Plasmodium* sp. trophozoite in a wild capybara blood smear from Itaipu, what stimulate this work, which reports the *Plasmodium* sp. survey in wild and captive capybara samples, through light microscopy and PCR. For the survey, it was collected total blood samples from 33 wild and captive capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*), of the RBV, between August 2007 and August 2008. Of the total of animals evaluated by microscopy (31), just one presented detectable parasitemia (3.2%). By PCR, of 33 samples, three (9%) was detected as positive to *Plasmodium* sp., including the positive animal by microscopy. The sequencing showed 73.8% of similarity to primate species including men; 73% to rodent species; 75% to avian species and 77.2% to lizard species. The higher similarity found (78.57 and 77.98%) was to *P. mexicanum*, from lizards. Thus, it is concluded that capybara is a susceptible host to *Plasmodium* sp. infection. The parasitemia and occurrence found was low. PCR was more sensitive than microscopy. The *Plasmodium* sp. infection did not caused hematological alterations verified by CBC.

Key words: Diagnosis. *Plasmodium*. Capybaras.

4.1 INTRODUÇÃO

O *Plasmodium* é um protozoário pertencente ao filo Apicomplexa e possui mais de 100 espécies que causam a malária em um grande número de vertebrados, incluindo os seres humanos, outros primatas, roedores, aves e répteis (WARREL, 2002).

A malária humana distribui-se pela África, Ásia e Américas e permanece como a mais prevalente doença endêmica mundial, constituindo-se um dos principais obstáculos ao desenvolvimento das comunidades e países (ÁVILA e FERREIRA, 1996). Por suas altas taxas de morbidade e mortalidade, tem um grande impacto econômico e social nas regiões afetadas, que coincidem com os países mais pobres do mundo (CERUTTI-JÚNIOR, 2007; GARDNER e LUCIW, 2008).

Já a malária em mamíferos não humanos merece atenção primeiro por seu papel na pesquisa experimental, sendo as espécies que infectam roedores e primatas extensivamente utilizadas como modelos experimentais em animais de laboratório (LANDAU e GAUTRET, 1998; GALLAND, 2000). Além disso, existem relatos de transmissão zoonótica envolvendo primatas não humanos na Ásia e demonstração de forte suspeita com macacos da América do Sul (DE THOISY *et al.*, 2000; MCCUTCHAN, 2008; DUARTE *et al.*, 2008), o que destaca a importância de estudos com essas espécies. Mas fora desses contextos, a malária em mamíferos ainda é pouco conhecida e existe a necessidade de se obter mais informações a respeito de outros hospedeiros e da doença nesses animais.

Em roedores, a infecção por espécies de *Plasmodium* foi descrita apenas em ratos africanos dos gêneros *Thamnomys*, *Grammomys* e *Praomys* e no porco espinho *Atherurus africanus* (PERKINS *et al.*, 2007). A capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) é o maior roedor do mundo e habita ambientes semiaquáticos nas Américas Central e do Sul (OLIVEIRA e BONVICINO, 2006), regiões que coincidem geograficamente com a distribuição de transmissão da malária. Apesar dessa potencial exposição ao vetor, não são encontrados relatos da capivara como hospedeiro de *Plasmodium* sp.

Em março de 2007, uma capivara de vida livre foi encontrada ferida no Refúgio Biológico Bela Vista, da Itaipu Binacional, em Foz do Iguaçu, Paraná, e foi levada ao Hospital Veterinário dessa instituição. Durante o exame hematológico de rotina no Laboratório Ambiental, foi encontrada uma inclusão intraeritrocitária

semelhante a um trofozoítio de *Plasmodium* sp. (FIGURA 1). Com esse achado levantou-se a suspeita de que as capivaras podem ser hospedeiras de *Plasmodium* e foi programada uma campanha de coleta de sangue dos animais do RBV, na qual se insere esse trabalho.

O objetivo desse capítulo então, é descrever o trabalho de pesquisa de *Plasmodium* sp. em amostras de sangue de capivaras de cativeiro e de vida livre por microscopia ótica e do respectivo DNA pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).



FIGURA 1 – TROFOZOÍTO DE *Plasmodium* sp. ENCONTRADO NO ESFREGAÇO SANGUÍNEO DE UMA CAPIVARA DE VIDA LIVRE
FONTE: SANTOS, 2007¹

¹ SANTOS, L. C. Comunicação pessoal. Mar/2007. Itaipu Binacional, Foz do Iguaçu, PR, BR.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Local de estudo

Os animais incluídos nesse trabalho pertenciam ao Refúgio Biológico Bela Vista (RBV), situado dentro da área da Usina Hidrelétrica Itaipu Binacional, localizada em Foz do Iguaçu, estado do Paraná, na região sul do Brasil (25°32'45"S, 54°35'07"W).

O RBV consiste em uma área de 1.920 hectares, onde estão situados o Criadouro de Animais Selvagens da Itaipu Binacional (CASIB), o Zoológico Roberto Ribas Lange (Zoo RRL) e o Hospital Veterinário (HV) (Mapas no ANEXO 3).

Os animais de cativeiro vivem junto com antas (*Tapirus terrestris*) e catetos (*Tayassu tajacu*) em um recinto constituído de chão de terra, gramado, árvores e lago e cercado por tela e com mata ao redor, na área temática do Zoo RRL denominada "Ambiente e Espaço". Existe no local uma construção de manejo, com baias individuais para manipulação dos animais e um tanque de cerca de 150 m² com água bombeada da represa principal, que está distante cerca de 80 m.

Os animais de vida livre residem soltos pela Itaipu Binacional e podem se aproximar dos animais que estão dentro do recinto pela cerca.

A manipulação inicial das amostras e os hemogramas foram realizados no Laboratório Ambiental da Itaipu Binacional, no setor de hematologia e bioquímica.

4.2.2 Animais e amostras

Para a realização dessa pesquisa foram coletadas amostras de sangue total de 33 capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*), de cativeiro e de vida livre do RBV, entre agosto de 2007 e agosto de 2008.

4.2.2.1 Animais de cativeiro

Foram coletadas amostras de dez animais adultos, três machos e sete fêmeas, residentes no Zoo RRL do RBV e uma fêmea adulta de vida livre que estava em tratamento no HV. Os dados dos animais estão listados no QUADRO 5.

Animal	Identificação	Procedência	Sexo	Peso (kg)	Nascimento
1	Zoo 005	cativeiro	F	61	27/05/03
2	Casib 2355	cativeiro	M	32	08/12/05
3	Zoo 009	cativeiro	F	50,3	19/06/05
4	Zoo 011	cativeiro	F	61,5	19/06/05
5	Zoo 010	cativeiro	F	56,5	19/06/05
6	Zoo 203	cativeiro	F	46	07/12/05
7	Zoo 004	vida livre	M	50,7	capturado: 12/12/01
8	Casib 2353	cativeiro	F	44,8	08/12/05
9	Casib 2354	cativeiro	F	29	08/12/05
10	Zoo 182	vida livre	M	50,4	capturado: 30/08/06 (45 kg)
11	HV 133	vida livre	F	37,8	capturado: 13/07/07 soltura: 11/09/07

QUADRO 5 – DADOS DAS CAPIVARAS DE CATIVEIRO DO RBV – ITAIPU BINACIONAL, FOZ DO IGUAÇU
FONTE: O autor (2008)

A alimentação dos animais consiste de ração comercial de equinos, capim e hibisco. O manejo sanitário desses animais é realizado com aplicação de ectoparasiticida quando julgado necessário, além da realização de tratamento adequado quando algum animal apresenta lesão ou doença.

As coletas dos animais de cativeiro foram feitas em um só dia de trabalho, na parte da manhã, em agosto de 2007. Para a contenção, os animais foram manejados nas baias, fez-se a contenção física de um animal por vez em puçá e posterior contenção química (ver item 4.2.3). Os animais foram então pesados e identificados.

4.2.2.2 Animais de vida livre

Foram capturados e amostrados 20 animais de vida livre, de idades variadas, sete machos e 13 fêmeas. Quatro foram considerados adultos (com 60 a 79 kg), e 16 jovens ou filhotes (com 11 a 47 kg). Esses animais habitavam uma área junto ao lago do Canal da Piracema, ao lado da estrada principal, na entrada da Usina (ANEXO 3), cujo ambiente era constituído de gramado, lago, ilha e ampla área de floresta.

As capturas foram realizadas com auxílio de um recinto construído em área sombreada na beira do lago e do lado oposto à estrada, em local de grande movimento de animais. Esse recinto foi construído em tela e mourões de madeira, com três repartições separadas por tela e portas de madeira para facilitar o manejo

dos animais. Existia também um corredor na entrada do recinto, com uma grande entrada fechada por portão de tela e que se afunilava até a entrada da área maior do recinto (área comum). Nesse corredor era fornecida cana-de-açúcar em planta inteira para a atração dos animais, que também era espalhada por todo o recinto. Era também fornecida água fresca, em recipientes de cimento espalhados pelas baias (FIGURAS 2 e 3).

Esses animais foram capturados em dois momentos distintos em 2008: no dia seis de maio, quando foi possível a captura de apenas quatro animais; e no dia 26 de agosto, quando foram capturados 16 animais. Os animais foram fechados na manhã do dia de coleta (em maio) ou no fim da tarde anterior (em agosto) e a contenção farmacológica foi realizada no período da manhã (das 10 às 12h30) dos dias de coleta. Os animais eram manejados nas subdivisões do recinto de captura, capturados com auxílio de puçá, pesados e contidos quimicamente (FIGURA 4).

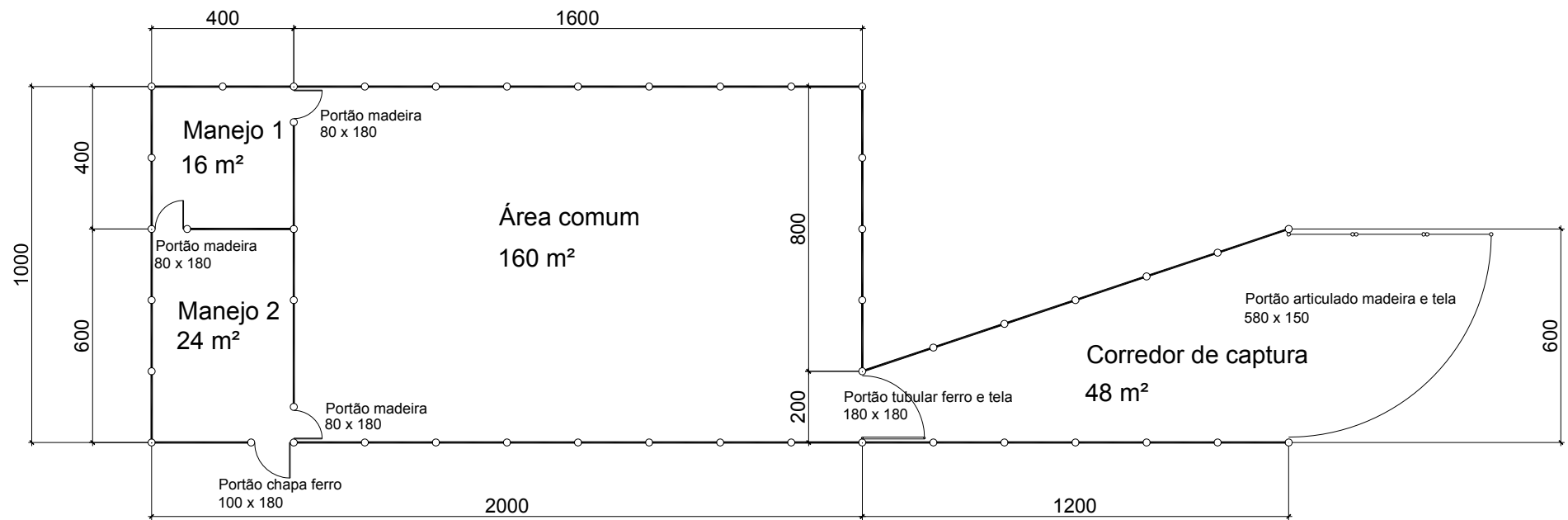


FIGURA 2 – PLANTA BAIXA DO RECINTO DE CAPTURA
FONTE: CUROTTO, 2009



FIGURA 3 – RECINTO DE CAPTURA DE CAPIVARAS DE VIDA LIVRE – ITAIPU BINACIONAL, FOZ DO IGUAÇU: ÁREAS DE CAPTURA
A: PORTÃO DE ENTRADA. B: FIM DO CORREDOR DE CAPTURA E ENTRADA DA ÁREA COMUM
FONTE: O autor (2008)



FIGURA 4 – RECINTO DE CAPTURA DE CAPIVARAS DE VIDA LIVRE – ITAIPU BINACIONAL, FOZ DO IGUAÇU: ÁREAS DE MANEJO
A: CAPIVARAS CAPTURADAS. B: ANIMAL CONTIDO NO PUÇÁ E ANESTESIADO
FONTE: O autor (2008)

4.2.3 Contenção química

A contenção química foi realizada através de anestesia, por injeções intramusculares dos fármacos associados na mesma seringa plástica descartável de 10 ml, com agulha 30x7 mm. Os fármacos utilizados foram cloridrato de cetamina 10% (Ketamina Agener 10%, Agener União, Embu-Guaçu - SP), cloridrato de xilazina 2% (Anasedan, Vetbrands, Jacareí – SP) e sulfato de atropina 1% (Atropina 1%, Fagra, São Paulo – SP), nas doses de 7 mg/kg de cetamina, 0,5 mg/kg de xilazina e 0,05 mg/kg de atropina (ROBES *et al.*, 2008).

4.2.4 Colheita e armazenamento das amostras

Foram coletados por venopunção das veias femoral ou safena aproximadamente 15 ml de sangue, com seringa plástica descartável de 20 ml e agulha 40x12 mm (FIGURA 5), transferindo-se imediatamente 10 ml para dois tubos de 5 ml contendo anticoagulante (ácido etilenodiamino tetra-acético – EDTA 10%) para a realização de hemograma, dosagem de proteína plasmática total e PCR, e o restante em um tubo de 10 ml sem anticoagulante para a obtenção do soro, destinado à realização de outros trabalhos.

As amostras para o hemograma foram mantidas em isopor por cerca de duas horas e enviadas ao Laboratório Ambiental para processamento e as amostras destinadas à PCR foram aliquotadas em microtubos de plástico tipo eppendorf com capacidade de 1,5 ml e congeladas em freezer à -70°C (amostras dos animais de cativeiro) ou -20°C (amostras dos animais de vida livre).

Esfregaços sanguíneos e lâminas de gotas espessas foram realizadas imediatamente após cada coleta, com sangue sem anticoagulante em lâminas de vidro.

Foram incluídas nesse trabalho, para a realização de PCR, duas amostras de animais de vida livre que foram capturados e amostrados para tratamento no HV, entre os meses de julho e agosto de 2008 e que estavam congeladas a -20°C no Laboratório Ambiental.

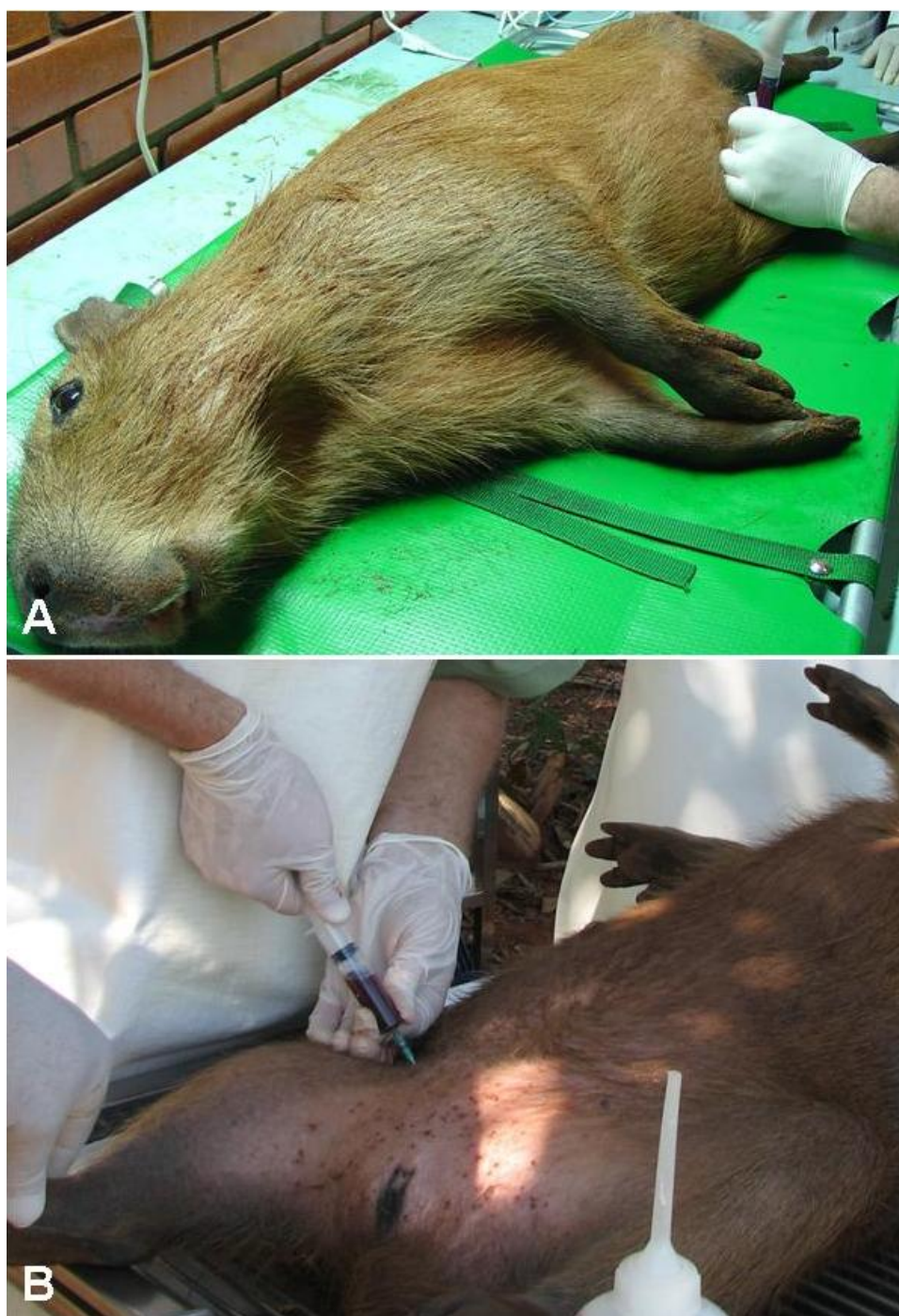


FIGURA 5 – COLETAS DE SANGUE DE CAPIVARAS DO RBV - ITAIPU
A: CAPIVARA DE CATIVEIRO. B: CAPIVARA DE VIDA LIVRE
FONTE: O autor (2008)

4.2.5 Hemograma

Os hemogramas foram realizados segundo Jain (1993). Após secagem ao ar, os esfregaços foram corados pelo método de May Grünwald-Giemsa (Newprov, Pinhais, PR, Brasil) e foi realizada contagem diferencial de leucócitos em 100 células e exame qualitativo das células sanguíneas por microscopia ótica, em aumento de 1000X, com imersão em óleo.

O hematócrito foi realizado por centrifugação do sangue em tubo capilar. As contagens dos leucócitos totais e hemácias foram realizadas manualmente, em hemocítômetro (Câmara de Neubauer®), com diluição em líquido de Türk e solução salina, respectivamente. A dosagem de hemoglobina foi realizada pelo método de cianometahemoglobina com diluição em solução de Drabkin e leitura em espectrofotômetro BTS-310 (BioSystems S.A., Barcelona, Espanha) em 540 nm.

Os índices hematimétricos volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram calculados a partir dos valores da contagem de hemácias, dosagem de hemoglobina e do hematócrito.

4.2.6 Proteína plasmática total

Após a leitura do hematócrito no tubo capilar de micro-hematócrito, esse tubo foi quebrado na altura do plasma e a proteína plasmática total mensurada por refratometria (JAIN, 1993).

4.2.7 Pesquisa de *Plasmodium* sp. por microscopia ótica

Durante a realização da contagem diferencial de leucócitos no esfregaço sanguíneo foi feita a procura direta do parasita na lâmina. Também foi realizado o exame de gota espessa, pela técnica descrita por Santos (1999). Foram colocadas quatro gotas de sangue em uma lâmina de vidro, sendo duas em cada extremidade. O sangue foi então espalhado, formando dois retângulos em cada lâmina. Após secagem ao ar, as lâminas foram depositadas verticalmente em um recipiente com água, onde permaneceram por cerca de meia hora. Depois de secarem, foram então

coradas com corante de May Grünwald-Giemsa (Newprov, Pinhais, PR, Brasil) e observadas ao microscópio ótico em aumento de 1000X.

As lâminas de gota espessa foram examinadas em toda a sua extensão e os esfregaços foram percorridos por toda a área denominada de microscopia, local onde se realiza as avaliações qualitativas e quantitativas das células sanguíneas.

4.2.8 Extração de DNA

As amostras dos animais de cativeiro foram processadas em outubro de 2007, no Laboratório de Malária da SUCEN, localizado no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. As extrações do DNA foram realizadas pelo protocolo de rotina do Laboratório, que consistia em uma lise inicial com 1-1,5 ml de solução de saponina 1% e posterior uso de kit comercial GFX Genomic Blood DNA Purification Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA). Inicialmente, após o descongelamento foi realizada a centrifugação (8.000 rpm, 5 minutos) e descarte do plasma das amostras. A saponina foi então adicionada à papa de hemácias, fez-se forte homogeneização em vórtex e incubou-se as amostras à 37°C por 5 minutos. Depois, as amostras foram centrifugadas à 3.500 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e os *pellets* submetidos a lavagem com água ultrapura por duas vezes. As lavagens foram realizadas adicionando-se água ultrapura, homogeneizando, centrifugando as amostras (3.500 rpm, 5 minutos) e descartando os sobrenadantes.

Na sequência, os *pellets* foram submetidos ao protocolo de extração com kit comercial de coluna, seguindo as orientações do fabricante. Primeiramente foram adicionados 900 µl de RBC Lysis Solution, feita a homogeneização e depois de 5 minutos em temperatura ambiente, fez-se a centrifugação (14.000 rpm, 1 minuto) e descarte dos sobrenadantes. Foram então adicionados 500 µl da solução Extraction Solution, realizada intensa homogeneização em vórtex e as amostras foram transferidas para as colunas de ligação do DNA encaixadas em tubos de descarte do kit identificados. Os tubos foram centrifugados (8.000 rpm, 1 minuto), o filtrado foi descartado e foram adicionados mais 500 µl do Extraction Solution e a centrifugação foi repetida. Para a lavagem do material extraído, foi realizada a adição de 500 µl da solução Wash Solution e as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 3 minutos. Para a eluição do DNA as colunas foram transferidas para tubos de 1,5 ml

identificados e foi adicionada em cada amostra 100 µl de água ultrapura pré aquecida à 70°C. Então, as amostras foram centrifugadas por um minuto a 8.000 rpm, obtendo-se o DNA extraído de cada amostra.

As amostras dos animais de vida livre foram extraídas em outubro de 2008, no Centro Diagnóstico Marcos Enrietti, na Divisão de Biologia Molecular. Todo o protocolo de extração foi idêntico ao anterior, com uso do mesmo kit de extração. Porém, a saponina 1% para a lise inicial das amostras foi substituída por um tampão de lise de hemácias, cuja fórmula está descrita no QUADRO 6.

COMPONENTE	QUANTIDADE
Sacarose	27,4 g
Triton X100	2,5 ml
MgCl ₂ .6H ₂ O 1 M	1,25 ml
Tris pH 7,5 1M	3 ml
Água bidestilada qsp	50 ml

QUADRO 6 – SOLUÇÃO ESTOQUE DO TAMPÃO DE LISE DE HEMÁCIAS RCLB 5X
FONTE: O autor (2009)

4.2.9 Quantificação de DNA

Para quantificação e análise do DNA no material extraído, após o protocolo de extração, as amostras dos animais de cativeiro foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. As dos animais de vida livre foram verificadas em espectrofotômetro (WPA UV 1101, Biotech Photometer, Cambridge, UK), em comprimento de onda de 260 nm.

4.2.10 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As amostras dos animais de cativeiro foram submetidas a um protocolo de *nested* PCR descrita por Singh *et al.* (1999), que amplifica uma região do gene 18S, do RNA da subunidade menor do ribossomo (ssrRNA) de todos os *Plasmodium* (PCR A). A primeira reação desse protocolo foi modificada e, ao invés de se utilizar o *primer* reverso rPLU5, foi utilizado o rPLU6 (SNOUNOU *et al.*, 1993), denominado rPLU6R.

As reações foram realizadas em um volume total de 25 µl, constituídas de

0,25 μ M de cada um dos primers, 5 μ l da solução comercial Taq Master 5X (Jena Biosciences, Jena, Alemanha), que continha $MgCl_2$, KCl, estabilizadores, dNTPs e Taq DNA polimerase e água ultrapura para corrigir o volume da reação para 20 μ l. Em seguida, foram adicionados 5 μ l de amostra em cada microtubo e as reações foram processadas em termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Para a reação 2, as condições reacionais foram as mesmas descritas anteriormente e 1 μ l do produto da primeira reação foi utilizado como amostra.

O DNA extraído das amostras dos animais de vida livre foram processadas no Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN-PR), em São José dos Pinhais, PR, com a utilização de outro protocolo, denominado PCR B. O *primer* anverso da primeira reação deste protocolo foi o mesmo do protocolo anterior e o reverso da segunda reação teve apenas seis pares de bases retirados. Os demais foram desenhados em regiões próximas dos anteriores, com observação das sequências da região amplificada alinhadas no programa BioEdit (Biological Sequence Alignment editor v7.0.9, Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, EUA). O cálculo da temperatura de *melting* de cada *primer* foi realizado pelo *software* Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As modificações foram feitas para se obter *primers* em regiões de mínimo polimorfismo gênico e com o mínimo de complementaridade entre os pares. O alinhamento da sequência alvo com os sítios de anelamento dos *primers* estão no ANEXO 4. As descrições dos *primers* utilizados nos dois protocolos estão no QUADRO 7.

PCR		PRIMER	SEQUÊNCIA (5' – 3')
A	reação 1	rPLU1	TCA AAG ATT AAG CCA TGC AAG TGA
		rPLU6R	CGT TTT AAC TGC AAC AAT TTT AA
	reação 2	rPLU3	TTT TTA TAA GGA TAA CTA CGG AAA AGC TGT
		rPLU4	TAC CCG TCA TAG CCA TGT TAG GCC AAT ACC
B	reação 1	rPLU1	TCA AAG ATT AAG CCA TGC AAG TGA
		rPLU7R	GCA CCA GAC TTG CCC TCC A
	reação 2	rPLU3b	ATG TAG AAA CTG CGA ACG GCT C
		rPLU4b	TCA TAG CCA TGT TAG GCC AAT ACC

QUADRO 7 – NOMES E SEQUÊNCIAS DOS *PRIMERS* UTILIZADOS NOS DOIS PROTOCOLOS DE PCR (PCR A E PCR B)

FONTE: O autor (2009)

Antes de se realizar as PCRs, foi realizado uma etapa de otimização, fazendo-se reações com uma amostra de sangue de paciente humano com

Plasmodium falciparum, para teste de funcionalidade dos primers e das condições de amplificação. Com isso, foi testado também o protocolo de extração. O sangue foi extraído pelo protocolo de rotina do LACEN-PR (GenomicPrep Blood DNA Isolation Kit, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA) e pelo protocolo utilizado nas amostras dos animais de cativeiro (ver item 4.2.8). Os testes foram feitos em duplicatas.

A amplificação do DNA foi realizada num volume final de 50 µl, com a mistura da reação 1 consistindo de 1 µM de cada primer (IDT, Coralville, IA, EUA), 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 2 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) e 1,25 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). O volume da mistura de reação foi corrigido com água ultrapura para 45 µl. A seguir foram adicionados 5 µl de DNA extraído. Para a reação 2, a montagem das reações foi realizada da mesma maneira, porém com o volume corrigido com água para 48 µl e adição de 2 µl de produto da reação 1. As termociclagens foram realizadas no aparelho Mastercycler EP Gradient S (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). e as condições de termociclagem estão especificadas no QUADRO 8.

FASE DO CICLO	TEMPERATURA (°C) / TEMPO		
	PCR A		PCR B
	reação 1	reação 2	reações 1 e 2
Desnaturação inicial	94 / 4 min	94 / 4 min	94 / 5 min
1 -Desnaturação	94 / 30 s	94 / 30 s	94 / 30 s
2 -Anelamento	55 / 1 min	62 / 1 min	55 / 30 s
3 -Extensão	72 / 1 min	72 / 1 min	72 / 1 min
Extensão final	72 / 4 min	72 / 4 min	72 / 7 min
Número de ciclos (fases 1 a 3)	35	35	35

QUADRO 8 – CONDIÇÕES DAS TERMOCICLAGENS EM CADA REAÇÃO DE PCR, NOS DOIS PROTOCOLOS UTILIZADOS

FONTE: O autor (2009)

4.2.11 Visualização dos produtos

Amostras dos produtos de PCR obtidos (20 µl, na PCR A ou 10 µl, na PCR B) e 6 ng de marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Fermentas, Glen Burnie, MD, EUA ou Promega Corporation, Madison, WI, EUA) foram aplicados em gel de agarose a 1 (PCR A) ou 1,5% (PCR B) impregnado com brometo de etídio (0,5 µg/ml), utilizando cerca de 3 µl de Blue Loading Buffer para o carregamento. Os

produtos foram então separados por eletroforese horizontal usando TBE 1X como tampão de corrida, sob 160 V por 45 minutos. Em seguida, o gel de agarose foi exposto à luz ultravioleta em transiluminador para revelação dos fragmentos separados e comparação do tamanho dos fragmentos do produto da PCR com aqueles gerados pelo marcador de peso molecular.

O gel da PCR A foi fotografado com máquina fotográfica comum em preto e branco e a imagem transferida ao computador para visualização. Na PCR B, a imagem foi digitalizada em sistema de foto-documentação Kodak Digital Science – Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 (Kodak, Rochester, NY, EUA). A definição de resultados positivos e negativos baseou-se na identificação visual das bandas no gel de agarose, de tamanhos de 230 pb na PCR A e de 280 pb na PCR B.

4.2.12 Sequenciamento

Os produtos amplificados foram purificados do gel de agarose segundo Boyle e Lew (1995) e o sequenciamento foi realizado pelo método de terminação em cadeia (SANGER) utilizando kit comercial (BigDye™ terminator mix, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) nas duas direções com os *primers* internos (da PCR A - reação 2). As sequências consensuais finais foram submetidas ao GenBank (números EU623445 e EU623446) e foi realizado, com uso do software ClustalX versão 1.81 (THOMPSON *et al.*, 1997), o alinhamento das sequências obtidas com sequências existentes nesse banco de dados. Análises de máxima parsimônia foram feitas utilizando PAUP 4.0b10 (SWOFFORD, 1998), e a matriz de similaridade com uso do Point Replacer v2.0 (<http://www.geocities.com/alvesjmp/software.html>).

4.2.13 Análise estatística

A comparação dos dados obtidos nos hemogramas e na proteína plasmática total dos animais *Plasmodium* positivos e negativos e a comparação dos resultados dos animais de cativeiro e vida livre foi realizada através do teste estatístico de Mann-Whitney, com uso do software STATA 10.0 (College Station, TX, EUA), com valores de $P < 0,05$ considerados significantes.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Microscopia

Do total de animais avaliados pelo exame de microscopia (31), apenas um apresentou parasitemia detectada (3,2%), o número 9 de cativeiro, com o achado de dois trofozoítos no esfregaço sanguíneo (FIGURA 6).



FIGURA 6 – TROFOZOÍTOS DE *Plasmodium* sp. EM ESFREGAÇO DA CAPIVARA DE CATIVEIRO NÚMERO 9
FONTE: KIRCHGATTER, 2008¹

¹ KIRCHGATTER, K. Comunicação pessoal. Fev/2008. SUCEN, São Paulo, SP, BR

4.3.2 Extração do DNA

As amostras de DNA extraídas do sangue de paciente humano positivo pelos dois protocolos apresentaram a mesma positividade na PCR (FIGURA 7), demonstrando-se a eficácia do método de extração utilizado nas amostras.

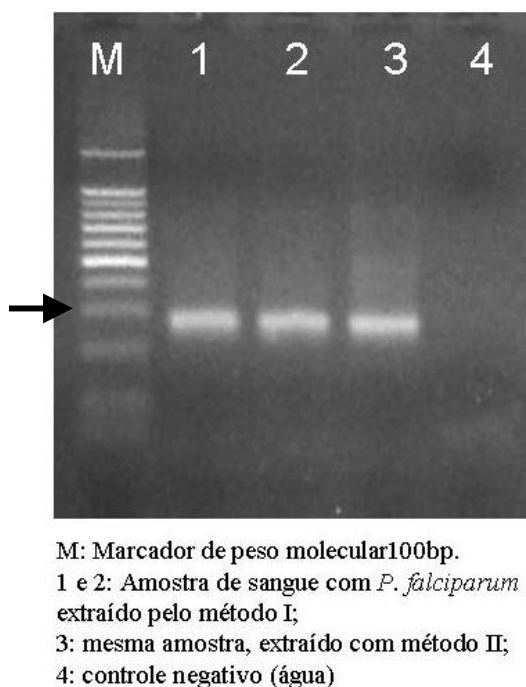
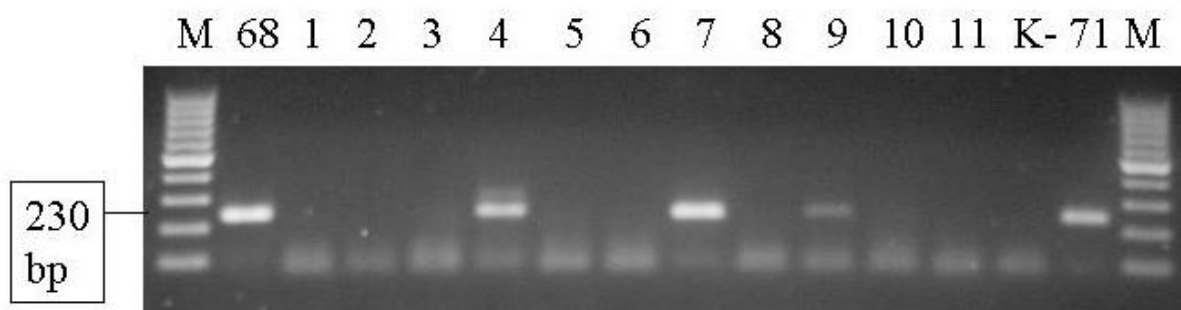


FIGURA 7 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1,5% DA AMOSTRA POSITIVA
 FONTE: O autor (2009)

NOTA: Método I: Extração com lise inicial e kit GFX Genomic Blood DNA Purification (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA). Método II: Extração de rotina do LACEN-PR, com o kit GenomicPrep Blood DNA Isolation (Amersham Biosciences)
 Seta: 300pb. Banda específica: 280pb

4.3.3 PCR e sequenciamento

Pela PCR, do total de 33 amostras avaliadas, três foram detectadas como positivas para *Plasmodium* sp., incluindo o animal positivo pela microscopia. Os animais que demonstraram positividade pela PCR foram as capivaras de cativeiro 4, 7 e 9 (9%) (FIGURA 8). Não foram detectadas amostras positivas entre aquelas dos animais de vida livre.



M = Marcador de Peso Molecular (100 bp Fermentas)

Controles positivos = amostras 68 (*Plasmodium sp*) e 71 (*P. malariae*)

Amostras 1 a 11 = gDNA de capivaras.

K- (água)

FIGURA 8 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% DE AMOSTRAS DE CAPIVARAS DE CATIVEIRO

FONTE: KIRCHGATTER, 2007¹

NOTA: Amostras positivas: 4, 7 e 9

O sequenciamento foi realizado nos produtos da PCR de duas capivaras positivas: CAP4 (GenBank EU623445) e CAP7 (GenBank EU623446). As análises dos alinhamentos das sequências demonstraram menos do que 1% de divergência entre elas.

Quando comparadas com sequências de *Toxoplasma gondii*, protozoário já descrito em capivaras no Brasil, foi demonstrada similaridade de 55% com a sequência de *T. gondii* mais semelhante encontrada (GenBank EF472967).

Com outras sequências de *Plasmodium*, a semelhança encontrada foi maior. Houve 73,8% de similaridade com espécies infectantes de primatas, incluindo o homem; 73% com espécies de roedores; 75% com espécies de aves e 77,2% com espécies infectantes de lagartos (QUADROS 9 e 10). A maior similaridade encontrada (78,57 e 77,98%) foi com o *P. mexicanum*, parasita de lagarto da América do Norte (Genbank L11716). As porcentagens de similaridade entre cada uma das espécies comparadas estão listadas no ANEXO 6 e a relação filogenética entre elas está ilustrada na árvore da FIGURA 9.

¹ KIRCHGATTER, K. Comunicação pessoal. Out/2007. SUCEN, São Paulo, SP, BR

Espécies	Número de acesso	Grupo (hospedeiro)	Distribuição geográfica
<i>P. falciparum</i>	AL929354	A (homem)	Trópicos
<i>P. malariae</i>	AF488000	A (homem)	Trópicos
<i>P. vivax</i>	DQ660817	A (homem)	Trópicos
<i>P. ovale</i>	AB182493	A (homem)	África tropical e Pacífico
<i>P. reichenowi</i>	Z25819	A (chimpanzé)	África tropical
<i>P. fragile</i>	M61722	A (macaco)	Ásia tropical
<i>P. knowlesi</i>	AY580317	A (macaco)	Ásia tropical
<i>P. cynomolgi</i>	L07559	A (macaco)	Ásia tropical
<i>P. simium</i>	PSU69605	A (macaco)	Trópicos no Novo Mundo
<i>P. berghei</i>	M14599	C (rato silvestre)	África tropical
<i>P. yoelii</i>	AF180727	C (rato silvestre)	África
<i>P. chabaudi</i>	DQ241815	C (rato silvestre)	África
<i>P. gallinaceum</i>	M61723	E	Ásia
<i>P. lophurae</i>	X13706	E	Velho Mundo
<i>P. cathemerium</i>	AY625607	E	entre Ásia e Austrália
<i>P. mexicanum</i>	L11716	D (lagarto)	América do Norte
<i>P. floridense</i>	L11717	D (lagarto)	Américas Central e do Norte

QUADRO 9 – NÚMEROS DE ACESSO NO GENBANK DAS SEQUÊNCIAS DE *ssrRNA* DE DIFERENTES ESPÉCIES DE *Plasmodium* USADAS PARA O ALINHAMENTO COM AS SEQUÊNCIAS DAS CAPIVARAS

FONTE: KIRCHGATTER, 2008¹

NOTA: A: primatas (incluindo o homem); C: roedores; D: répteis e E: aves

	A	B	C	D	E
A	89,4	73,8	82,5	73,9	81,2
B	73,8	99,4	73	77,2	75
C	82,5	73	95,9	76,9	84,5
D	73,9	77,2	76,9	73,8	75,9
E	81,2	75	84,5	75,9	92,7

QUADRO 10 – PORCENTAGEM DE SIMILARIDADE ENTRE AS SEQUÊNCIAS DE *ssrRNA* DAS ESPÉCIES DE *Plasmodium* DOS DIFERENTES GRUPOS DE HOSPEDEIROS

FONTE: : KIRCHGATTER, 2008¹

NOTA: A: primatas (incluindo o homem); B: capivaras; C: roedores; D: répteis e E: aves.

Em negrito: similaridades das sequências obtidas das amostras das capivaras com os grupos de hospedeiros

¹ KIRCHGATTER, K. Comunicação pessoal. Abr/2008. SUCEN, São Paulo, SP, BR

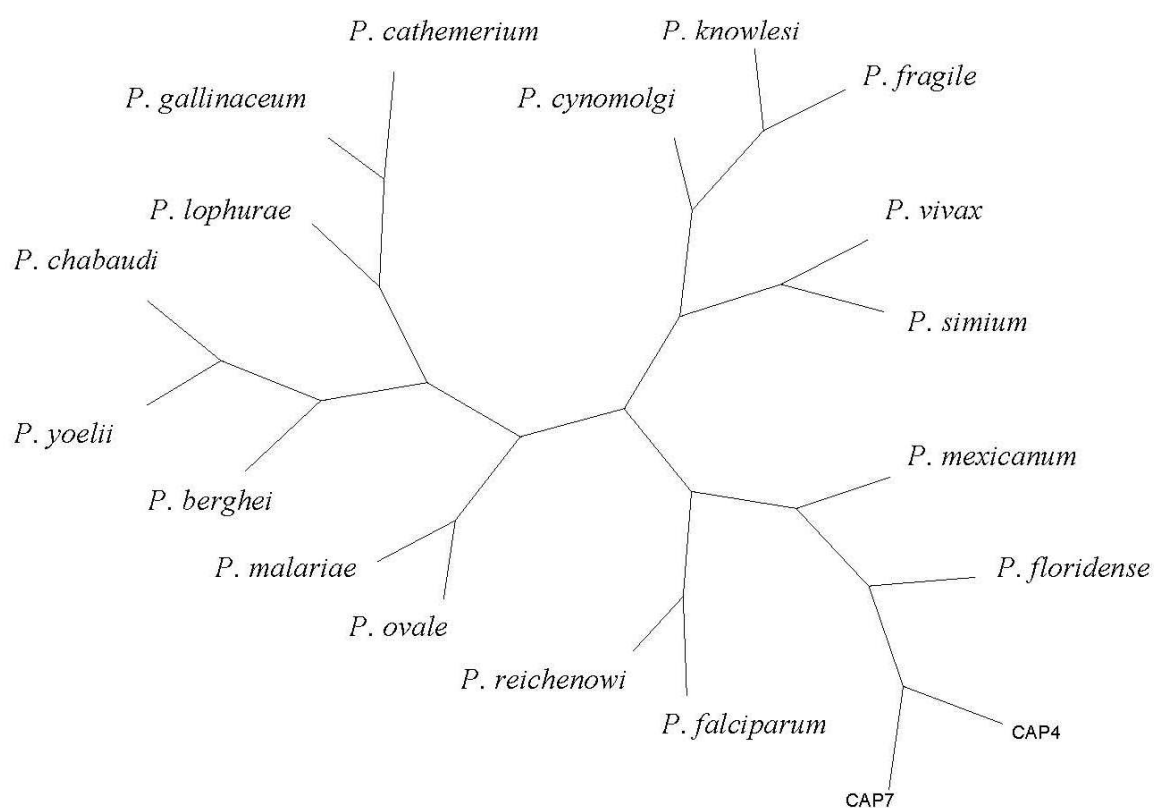


FIGURA 9 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DAS ESPÉCIES DE *Plasmodium* DESCRITAS NO QUADRO 9 E DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS DAS DUAS CAPIVARAS, COMPARADAS POR SEQUÊNCIAS DO GENE *ssrRNA*
 FONTE: KIRCHGATTER, 2008¹

¹ KIRCHGATTER, K. Comunicação pessoal. Nov/2008. SUCEN, São Paulo, SP, BR

4.3.4 Hemograma e proteína plasmática total

Foram realizados hemogramas do total de animais de cativeiro (10) e de 21 animais de vida livre. As médias e desvios padrões dos parâmetros avaliados nos hemogramas e da proteína plasmática total desses animais, separados por grupo, estão descritos nas TABELAS 1 e 2. Os resultados individuais por animal estão no APÊNDICE 1.

A presença da infecção por *Plasmodium* sp. não alterou os valores dos hemogramas e da proteína plasmática total, verificado pela ausência de diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

Porém, os resultados dos animais de vida livre diferiram dos de cativeiro na maioria dos parâmetros. Apenas os valores do CHCM e dos números absolutos de neutrófilos não apresentaram diferenças significativas estatisticamente ($P < 0,05$). As diferenças mais marcantes foram observadas na média do número de hemácias, menor nos animais de vida livre; no número total de leucócitos, cuja média entre os animais de vida livre foi quase o dobro da média dos de cativeiro; e na distribuição dos leucócitos.

TABELA 1 – MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DOS HEMOGRAMAS E PROTEÍNA PLASMÁTICA TOTAL DE 10 CAPIVARAS DE CATIVEIRO

	Hem (x10 ⁶ /μl)	Ht (%)	Hb (g/dl)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (%)	Leucócitos (/ul)	Neutr (%)	Neutr (/ul)	Linf (%)	Linf (/ul)	Mono (%)	Mono (/ul)	Eos (%)	Eos (/ul)	PPT (g/dl)
Média	3,66	43,5	13,93	119,92	38,54	32,04	5.225	53,5	2.861,9	40	2.026,2	5,8	300,7	0,5	30,9	7,62
Desvio	0,44	3,13	1,09	12,6	5,58	1,60	2.022,68	12,12	1.467	9,51	720,28	3,9	206,54	1,27	77,61	0,36

FONTE: O autor (2009)

NOTA: Hem: hemácias. Ht: hematócrito. Hb: hemoglobina. Neutr: neutrófilos. Linf: linfócitos. Mono: monócitos. Eos: eosinófilo. PPT: proteína plasmática total

TABELA 2 – MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DOS HEMOGRAMAS E PROTEÍNA PLASMÁTICA TOTAL DE 21 CAPIVARAS DE VIDA LIVRE

	Hem (x10 ⁶ /μl)	Ht (%)	Hb (g/dl)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (%)	Leucócitos (/ul)	Neutr (%)	Neutr (/ul)	Linf (%)	Linf (/ul)	Mono (%)	Mono (/ul)	Eos (%)	Eos (/ul)	Basof (%)	Basof (/ul)	PPT (g/dl)
Média	2,75	39,04	12,65	142,57	46,11	32,43	10.192,11	28,14	2.799,53	56,43	5.776	10,28	1.085,05	3,52	387,37	1,43	38,56	7
Desvio	0,37	4,54	1,63	14,49	4,9	2,58	2.516,52	13,05	1.101,47	14,81	2.410,87	5,33	714,99	2,96	340	1,2	36,67	0,99

FONTE: O autor (2009)

NOTA: Idem à anterior. Basof: basófilos

4.4 DISCUSSÃO

A utilização de curral com ceva mostrou-se um método eficiente para a captura e manejo de capivaras em condições de campo, o que concorda com Ferraz e Verdade (2001), que afirmam que esse é o método mais adequado para o manejo de capivaras em ambiente natural.

A escolha da época do ano em que se realiza a captura é um fator importante para o sucesso dos procedimentos, sendo o inverno uma estação conveniente, pois há menor disponibilidade de alimento e por isso os animais se interessam mais pela ceva; ao contrário do que acontece no verão, quando há uma oferta grande de alimento no ambiente natural dos animais (PEREIRA e ESTON 2007), o que pôde ser observado quando se tentou fazer a captura de animais em maio. A captura realizada no inverno, em agosto, possivelmente foi bem sucedida pela menor oferta de capim no ambiente e também por uma melhor adaptação dos animais ao curral. Além disso, a temperatura ambiente é mais adequada para procedimentos de captura e manejo de animais em campo.

O ponto diferencial no sucesso da metodologia de captura parece ser, além da escolha do local adequado, o fornecimento da isca mais palatável para os indivíduos da população local (MANGINI e NICOLAS, 2003). As capivaras têm uma dieta mista, constituída de um número grande de espécies vegetais (FORERO-MONTAÑA *et al.*, 2003). Em um trabalho de captura de capivaras de vida livre em São Paulo, as espigas de milho verde foram os mais consumidos pelas capivaras, dentre os alimentos oferecidos (PEREIRA e ESTON, 2007). Já no presente trabalho, os animais apresentaram melhor aceitação pela cana.

O método de contenção utilizado, com uso de puçá, é indicado para animais restritos a piquetes e pequenos recintos, como neste caso, e quando é possível a aproximação com baixo a moderado risco de acidente para o manipulador. Com o animal contido em puçá foi possível a aplicação de grandes volumes de anestésico de uma só vez, assim como a aplicação de uma dose precisa, obtendo-se efeito imediato e mais previsível, diminuindo o tempo de indução anestésica e melhorando o retorno anestésico (CUBAS, 2008¹).

Em condições de campo, são normalmente utilizados agentes anestésicos de

¹ CUBAS, Z. S. Comunicação pessoal. Set/2008. Itaipu Binacional, Foz do Iguaçu, PR, BR.

fácil administração, que permitam indução anestésica rápida e suave, analgesia adequada, bom relaxamento muscular, boa margem de segurança e que não causem depressão cardiorrespiratória (CRUZ *et al.* 1998). A associação de cetamina, xilazina e atropina proporcionou adequada imobilização dos animais para os procedimentos de exame físico e colheita de amostras biológicas. O cloridrato de cetamina é o agente anestésico mais usado em animais selvagens, sendo comumente associado a fármacos que promovam relaxamento muscular e potencializam a analgesia, como o cloridrato de xilazina (CORTOPASSI e FANTONI 2002).

A grande maioria dos animais capturados eram jovens ou filhotes, o que pode se explicar pela grande quantidade de animais nessa faixa etária na época da captura, além dos animais mais jovens andarem em bandos e serem menos ariscos, o que tornou mais fácil a abordagem dos grupos no local e o encaminhamento para dentro do recinto de captura.

Em relação aos hemogramas realizados, a análise estatística dos resultados dos animais infectados comparados aos não infectados revelou que não houve diferença entre eles, o que indica que a infecção pelo *Plasmodium* sp. presente nas capivaras não causou alteração hematológica. Nesse estudo, de animais selvagens infectados naturalmente pelo parasita, não seria mesmo esperado se encontrar muitas alterações. Apesar do parasitas do gênero *Plasmodium* infectarem uma variedade de hospedeiros vertebrados, eles raramente causam doença grave em qualquer outro hospedeiro que não os seres humanos (ZILVERSMIT e PERKINS, 2008). Nesses, a malária pode apresentar-se como uma doença branda a grave, com anemia de discreta a intensa, dependendo da espécie de parasita infectante (TUTEJA, 2007). Já em roedores e outros primatas, sabe-se que na maioria dos hospedeiros experimentais a infecção é aguda, enquanto que nos hospedeiros naturais é geralmente crônica, com baixas parasitemias e com poucos sinais clínicos que se resolvem espontaneamente (DEANE, 1992; LANDAU e CHABAUD, 1994; OZWARA *et al.*, 2003).

Apesar de não ser o objetivo direto desse trabalho de pesquisa, quando foram comparados os hemogramas dos animais de cativeiro com os de vida livre, as diferenças foram facilmente observadas em quase todos os parâmetros, sendo que apenas dois, do total de 18, não foram diferentes. Porém, deve-se levar em conta que, além desses dois grupos de animais viverem em condições diferentes com

alimentação, ambiente, exposição à fatores ambientais diversos, a maioria (16 do total de 20) dos animais de vida livre amostrados eram jovens, e é comum o padrão do hemograma de mamíferos mudar consideravelmente no decorrer da idade dos animais. Filhotes de cães, gatos, bois e cavalos por exemplo, possuem uma quantidade maior de linfócitos do que os animais adultos, podendo esse aumento ser de até duas vezes (STOCKHAM e SCOTT, 2002).

O resultado da pesquisa de *Plasmodium* sp. em lâminas de sangue dos animais revelaram apenas o animal 9 de cativeiro como positivo (1/31), enquanto que três foram positivos pela PCR (3/33), os animais 4, 7 e 9 de cativeiro. Esse resultado não causa surpresa, pois é sabido que mesmo que a microscopia seja o método de referência e um dos mais utilizados no diagnóstico de *Plasmodium* spp., sua sensibilidade e especificidade são limitadas por vários fatores, principalmente na presença de baixas densidades parasitárias (SNOUNOU *et al.*, 1993).

O limite da sensibilidade do exame microscópico é relatado como sendo de 500 a 1.000 parasitas por microlitro de sangue em esfregaço e de 5 a 10 em gota espessa (MYJAK *et al.*, 2002). No presente trabalho, no único esfregaço positivo, foram encontrados apenas dois trofozoítos, o que pode se considerar uma parasitemia de 10 parasitas/ μ l de sangue. A maior positividade apresentada pela PCR era o esperado de uma técnica molecular, comprovadamente mais sensível (MENS *et al.*, 2007).

O método de extração de DNA que foi aplicado nas amostras de sangue das capivaras foi escolhido por ser a metodologia de rotina do Laboratório de Malária da SUCEN. O procedimento de centrifugação das amostras é realizada com o intuito de se concentrar a maior quantidade possível de eritrócitos. O descarte do plasma e extração apenas da papa de células, aumenta a chance de se encontrar o parasita no DNA extraído.

O uso da saponina para se realizar lise dos eritrócitos é relatada em vários trabalhos. Por exemplo, em um trabalho de comparação de métodos de extração para a detecção de *Babesia gibsoni* em cães, os autores recomendam o uso de um método com lise utilizando saponina dos eritrócitos de sangue impregnado em papel filtro para a pesquisa de patógenos infecciosos no sangue (TANI *et al.*, 2008). Em outro artigo, é relatado um método com uso de saponina para extração de DNA para pesquisa de *P. vivax* e *P. falciparum* em sangue de pacientes do norte do Brasil. O sangue total era centrifugado, o plasma descartado e a extração era feita apenas

com adição de saponina ao *pellet* de células e lavagem do *pellet* com PBS. Os autores relatam que a purificação posterior do lisado das células com fenol clorofórmio não apresentou vantagens (SCHINDLER *et al.*, 2001).

Com as amostras das capivaras, o método de extração utilizado foi semelhante ao descrito pelo artigo anterior, porém com realização de extração do *pellet* após a lise com saponina através de kit comercial de coluna. Os testes realizados com a amostra positiva para *P. falciparum* revelou a mesma sensibilidade da PCR nos extraídos por dois métodos, um com a lise inicial e aplicação de kit de coluna e o outro com uso de kit comercial de uso padronizado na rotina do LACEN-PR, sendo demonstrada a eficácia do método de extração utilizado.

Esse trabalho relata o achado inédito de infecção por *Plasmodium* sp. em capivaras, detectado por exame de microscopia ótica, PCR e confirmada pelo sequenciamento dos produtos amplificados. As espécies de mamíferos que são reconhecidamente hospedeiras de *Plasmodium* spp. se restringem a primatas e ratos silvestres e porco espinho africanos, além de raros relatos em ungulados, morcegos e esquilos (ver item 2).

O primeiro achado de um trofozoíto intraeritrocitário no esfregaço sanguíneo de uma capivara de vida livre em 2007 era fortemente indicativo de um *Plasmodium* sp. E o resultado de mais uma lâmina com trofozoítos, durante os exames de microscopia propostos por essa pesquisa, corroborou com essa hipótese. Esses parasitas encontrados nos esfregaços sanguíneos foram identificados por profissionais treinados e com experiência no diagnóstico de malária, o que conferiu confiabilidade no diagnóstico realizado. Depois, pela PCR e sequenciamento, foi confirmada a suspeita de infecção nas capivaras.

Quando se trabalha com a técnica de PCR *nested*, deve-se levar em conta que ela é propensa a contaminação, pela necessidade de manipulação de reagentes e produtos antes da primeira reação, antes da segunda reação e novamente antes da eletroforese. Depois, para a detecção de possíveis resultados falso positivos ou negativos é importante considerar o fenômeno tudo ou nada, que pode ocorrer em técnicas extremamente sensíveis por PCR, quando se tenta detectar *Plasmodium* spp. em amostras com parasitemias muito baixas, onde o número de genomas adicionados à reação de PCR é próxima do limite de detecção. Nesses casos é provável que a mesma amostra seja positiva algumas vezes e em outras negativa (BOONMA *et al.*, 2007).

Nesse trabalho, o fato de se ter tomados cuidados básicos com a montagem das reações, da técnica utilizada ser de uso padronizado por um laboratório de referência minimizam a possibilidade de contaminação. Além disso, o resultado do sequenciamento dos produtos e análise de similaridade com outras espécies de *Plasmodium* confirmaram que o produto obtido era pertencente ao mesmo gênero, mas não a nenhuma das espécies comparadas. Os controles positivos usado na reação eram o *P. malariae*. A análise de similaridade com esse parasita foram 77,06 e 76,47%, inferiores às similaridades observadas com as sequências do *P. mexicanum*, de lagarto, que apresentou a maior similaridade encontrada, de 78,57% e 77,98%. A observação do quadro de porcentagens de similaridades entre as sequências das espécies parasitas dos diversos grupos de hospedeiros (QUADRO 10, item 4.3.3) demonstram que é esperada uma similaridade entre cerca de 74 a 84% entre as sequências de parasitas desse gênero.

Os *primers* rPLU3 e 4 têm sido também utilizados em técnicas de PCR simples, para amplificação de DNA das quatro espécies de *Plasmodium* de seres humanos, de um parasita símio (*P. gonderi*), e das espécies infectantes de roedores (*P. yoelii*, *P. berghei*, *P. chabaudi*, e *P. vincke*) (SINGH *et al.*, 1999). Os *primers* escolhidos para a realização da PCR B foram selecionadas em regiões semelhantes desses *primers*, e acredita-se que não tenha interferido na sensibilidade e especificidade, no que o teste dos primers com uma amostra positiva de *P. falciparum* demonstrou essa suposição.

O resultado esperado nessa pesquisa era que os animais de vida livre também apresentassem positividade, pois, além do primeiro achado de *Plasmodium* sp. ter sido em um animal de vida livre daquela região, ambas as populações estudadas, por habitarem locais muito próximos, estão expostas ao mesmo ambiente e provavelmente aos mesmos fatores de risco. Porém, como a PCR detecta a presença do parasita na circulação sanguínea do animal, trata-se de um resultado pontual. No instante da coleta não havia nenhum animal com parasitemia, o que não significa que eles não foram ou não virão a ser hospedeiros de *Plasmodium* sp., com parasitas circulantes em algum momento da vida.

Outro ponto a ser considerado é que os animais de vida livre têm uma maior tendência à exposição a antígenos ambientais, devido à ausência de manejos zootécnico e sanitário, podendo desenvolver um sistema imunológico particular para a defesa do organismo frente às diversas situações (MADELLA *et al.*, 2006). Pode

ocorrer desses animais adquirirem o parasita e rapidamente combaterem a infecção, não permitindo a instalação de parasitemia detectável. Talvez a realização de exames de sorologia poderiam atestar se eles entraram em contato com o parasita.

Finalmente, o uso dos *primers* modificados nessas amostras pode ter alterado a sensibilidade e/ou especificidade da técnica. Apesar desses *primers* serem semelhantes aos anteriores e a eficácia provavelmente não foi alterada, uma análise aprofundada para se comprovar o funcionamento deles se faz necessária e não foi possível de ser realizada no prazo desse trabalho.

Com relação a um possível vetor de malária nas capivaras, sabendo-se que em mamíferos a transmissão da malária se dá por fêmeas do mosquito de várias espécies do gênero *Anopheles* (COWMAN e CRABB, 2006), é de se esperar que nesses animais ocorra da mesma maneira. E na região estudada é comprovada a existência de vetores de malária humana e símia. Foz do Iguaçu é uma das localidades paranaenses consideradas de médio risco de ocorrência da doença (BRASIL, 2007). Existe também a transmissão de malária entre macacos, sendo o *Anopheles cruzi* o principal vetor entre esses primatas (DEANE, 1992)

Além disso, existem várias espécies de *Anopheles* naquela região, que podem agir como vetores da malária nos seres humanos e em outros mamíferos. Na área de influência da represa de Itaipu foram encontradas como espécies predominantes *Anopheles albitarsis*, *Anopheles evansae*, *Anopheles argyritarsis* e *Anopheles galvaoi* (SILVA, 2003). Pesquisadores concordam que o reservatório é a principal causa imediata da proliferação desses mosquitos (TEODORO *et al.*, 1995; FALAVIGNA-GUILHERME *et al.*, 2005).

Lembrando que as capivaras vivem ao lado do lago da Itaipu, em um ambiente extremamente propício para a manutenção de mosquitos *Anopheles*, é provável que alguma espécie desses mosquitos pode estar agindo como vetores do *Plasmodium* sp. nesses animais.

4.5 CONCLUSÕES

1. Conclui-se com esse trabalho que a capivara pode ser hospedeira natural de *Plasmodium* sp. e o parasita encontrado parece ser de uma nova espécie.
2. A parasitemia e a ocorrência encontradas na população de capivaras estudada foram baixas e a infecção não causou alterações hematológicas verificadas pelo hemograma.
3. A pesquisa do protozoário por PCR foi mais sensível do que a microscopia.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- ÁVILA, S. L. M.; FERREIRA, A. W. Malaria diagnosis: a review. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, p. 431-443, 1996.
- BOONMA, P.; CHRISTENSEN, P. R.; SUWANARUSK, R.; PRICE, R. N.; RUSSELL, B.; LEK-UTHAI, U. Comparison of three molecular methods for the detection and speciation of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*. **Malaria Journal**, v. 6, p. 124, 2007.
- BOYLE, J. S.; LEW, A. M. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. **Trends in Genetics**, v. 11, n. 1, p. 8, 1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária**. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br>>. Acesso em: 19 abr. 2007.
- CERUTTI-JÚNIOR, C.; BOULOS, M.; COUTINHO, A. F.; HATAB, M. C. L. D.; FALQUETI, A.; REZANDE, H. R.; DUARTE, A. M. R. C.; COLLINS, W.; MALAFRONT, R. S. Epidemiologic aspects of the malaria transmission cycle in an area of very low incidence in Brazil. **Malaria Journal**, v. 6, p. 33, 2007.
- CORTOPASSI S. R. G.; FANTONI D. T. Medicação pré-anestésica. In: **Anestesia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2002. p. 151-158.
- COWMAN, A. F.; CRABB, B. S. Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 755-766, 2006.
- CRUZ, M. L.; LUNA, S. P. L.; MOURA, C. A.; CASTRO, G. B.; TEIXEIRA NETO, F. J.; NISHIDA, S. M. Técnicas anestésica injetáveis em capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*, Linné). **Ciência Rural**, v. 28, n. 3, p. 411-415, 1998.
- CUROTTO, C. L. **Recinto de captura de capivaras**. Curitiba, 2009. 1f. Planta baixa.
- DEANE, L. M. Simian malaria in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, Suppl 3, p. 1-20, 1992.
- DE THOISY, B.; MICHEL, J. C.; VOGEL, I.; VIÉ, J. C. A survey of hemoparasite infections in free-ranging mammals and reptiles in French Guiana. **The Journal of Parasitology**, v. 86, n. 5, p. 1035-1040, 2000.
- DUARTE, A. M.; MALAFRONT, R. S.; CERUTTI, C. JR.; CURADO, I.; DE PAIVA, B. R.; MAEDA, A. Y.; YAMASAKI, T.; SUMMA, M. E.; NEVES, D. V.; DE OLIVEIRA, S. G.; GOMES, A. DE C. Natural *Plasmodium* infections in Brazilian wild monkeys: reservoirs for human infections? **Acta Tropica**, v. 107, n. 2, p. 179-185, 2008.

FALAVIGNA-GUILHERME, A. L.; SILVA, A. M.; GUILHERME, E. V.; MORAIS, D. L. Retrospective study of malaria prevalence and *Anopheles* genus in the area of influence of the binational Itaipu reservoir. **Revista da Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, n. 2, 2005.

FERRAZ, K. P. M. B.; VERDADE, L. M. Ecologia comportamental da capivara: Bases biológicas para o manejo da espécie. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: 2001, p. 589-595.

FORERO-MONTAÑA, J.; BETANCUR, J.; CAVELIER, J. Dieta del capibara *Hydrochaeris hydrochaeris* (Rodentia: Hydrochaeridae) en Caño Limón, Arauca, Colombia. **Revista de Biología Tropical**, v. 51, n. 2, p. 579-590, 2003.

GALLAND, G. G. Role of the squirrel monkey in parasitic disease research. **ILAR Journal**, v. 41, n. 1, 2000.

GARDNER M. B.; LUCIW P. A. Macaque models of human infectious disease. **ILAR Journal**, v. 49, n. 2, p. 220-255, 2008.

JAIN, N. C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417p.

LANDAU, I.; CHABAUD, A. G. *Plasmodium* species infecting *Thamnomys rutilans*: a zoological study. **Advances in Parasitology**, v. 33, p. 49-90, 1994.

LANDAU, I.; GAUTRET, P. Animal Models: Rodents. In: SHERMAN, I.W. **Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis and Protection**. Washington: ASM Press, 1998. p. 401-417.

MADELLA, D. A.; RODRIGUES NETO, E. J.; FELISBERTO, M. E.; SOUZA, C. E. Valores hematológicos de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) (Rodentia: Hydrochoeridae) de vida livre na região de Campinas-SP. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1321-1324, 2006.

MANGINI, P. R.; NICOLAS, P. A. Captura e marcação de animais silvestres. In: CULLEN JR., L.; RUDRAN, R.; VALLADARES-PÁDUA, C. **Biologia da conservação & manejo da vida silvestre**. Curitiba: UFPR, Fundação O Boticário de Proteção à Natureza, 2003. p. 91-124.

MCCUTCHAN, T. F. Is a monkey malaria from Borneo an emerging human disease? **Future Microbiology**, v. 3, p. 115-118, 2008.

MENS, P.; SPIEKER, N.; OMAR, S.; HEIJNEN, M.; SCHALLIG, H.; KAGER, P. A. Is molecular biology the best alternative for diagnosis of malaria to microscopy? A comparison between microscopy, antigen detection and molecular tests in rural Kenya and urban Tanzania. **Tropical Medicine and International Health**, v. 12, n. 2, p. 238-244, 2007.

MYJAK, P.; NAHORSKI, W.; PIENIAZEK, N. J.; PIETKIEWICZ, H. Usefulness of PCR for diagnosis of imported malaria in Poland. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 21, n. 3, p. 215-218, 2002.

OLIVEIRA, J. A.; BONVICINO, C. R. Ordem Rodentia. In: REIS, N. R., PERACHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. **Mamíferos do Brasil**. Londrina: UEL, 2006. p. 347-400.

OZWARA, H.; LANGERMANS, J. A.; MAAMUN, J.; FARAH, I. O.; YOLE, D. S.; MWENDA, J. M.; WEILER, H.; THOMAS, A. W. Experimental infection of the olive baboon (*Papio anubis*) with *Plasmodium knowlesi*: severe disease accompanied by cerebral involvement. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, n. 2, p. 188-194, 2003.

PEREIRA, H. F. A.; ESTON, M. R. Biologia e manejo de capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) no parque estadual Alberto Löfgren, São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto Florestal**, v. 19, n. 1, p. 55-64, 2007.

PERKINS, S. L.; SARKAR, I. N.; CARTER, R. The phylogeny of rodent malaria parasites: Simultaneous analysis across three genomes. **Infections, Genetics and Evolution**, v. 7, n. 1, p. 74-83, 2007.

ROBES, R. R.; CUBAS, Z. S.; MORAES, W.; OLIVEIRA, M. J.; STEL, R. F.; SANTOS, L. C.; CUROTTO, S. M. R.; BARROS-FILHO, I. R.; BIONDO, A. W. Parâmetros fisiológicos na anestesia de capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) de vida livre com a associação de cetamina, xilazina e atropina. In: XI Congresso da ABRAVAS, 2008, Santos. **Anais...** Santos: ABRAVAS, 2008. p. 211-214.

SANTOS, L. C. **Laboratório Ambiental**. Cascavel: Edunioeste, 1999. 323p.

SCHINDLER, H. C.; MONTENEGRO, L.; MONTENEGRO, R.; CARVALHO, A. B.; ABATH, F. G.; JAUREGUIBERRY, G. Development and optimization of polymerase chain reaction-based malaria diagnostic methods and their comparison with quantitative buffy coat assay. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 4, p. 355-361, 2001.

SILVA, A. M. Um estudo sobre a malária no Paraná. Fauna anofélica (Diptera: Culicidae) da reserva indígena do Ocoí, município de São Miguel do Iguaçu, Paraná. Saúde no Paraná. **Boletim Epidemiológico da Secretaria de Saúde do Paraná**, n. 18, 2003.

SINGH, B.; BOBOGARE, A.; COX-SINGH, J.; SNOUNOU, G.; ABDULLAH, M. S.; RAHMAN, H. A. A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, p. 687-692, 1999.

SNOUNOU, G.; VIRIYAKOSOL, S.; JARRA, W.; THAITHONG, S.; BROWN, K. N. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. **Molecular and Biochemistry Parasitology**, v. 58, p. 283-292, 1993.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. Leukocytes. In: **Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology**. Iowa: Iowa State Press, 2002. p.49-83.

SWOFFORD, D. L. PAUP*. **Phylogenetic Analysis Using Parsimony** (*and Other Methods). Version 4, Sinauer Associates Sunderland, MA. 1998

TANI, H.; TADA, Y.; SASAI, K.; BABA, E. Improvement of DNA extraction method for dried blood spots and comparison of four PCR methods for detection of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) infection in canine blood samples. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 70, n. 5, p. 461-467, 2008.

TEODORO, U.; FALAVIGNA-GUILHERME, A. L.; LOZOVEI, A. L.; SALVIA FILHO, V. L.; FUKUSHIGUE, Y.; SPINOSA, R. P.; FERREIRA, M. E. M. C.; BARBOSA, O. C.; LIMA, E. M. Culicídeos do lago de Itaipu, no rio Paraná, Sul do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 29, n. 1, p. 6-14, 1995.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAC, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 4876–4882, 1997.

TUTEJA, R. Malaria - an overview. **The FEBS Journal**, v. 274, n. 18, p. 4670-4679, 2007.

WARREL, D. A. Clinical features of malaria. In: **Essential Malariology. International Students Edition**. 4 ed. Oxford: University Press, 2002. p.191-205.

ZILVERSMIT, M.; PERKINS, S. *Plasmodium*. Malaria Parasites. 05 May 2008. Disponível em: <<http://tolweb.org/Plasmodium/68071/2008.05.05>>. Acesso em 30/09/2008.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um clínico que depende do laboratório para o seu diagnóstico é provavelmente inexperiente; um que diz que não precisa de um laboratório é desinformado. Em ambos os casos, o paciente está em perigo.

(Halsted, J. A., citado por Meyer e Harvey, 1998)

Nos últimos anos foram observados vários casos de excedente populacional de capivaras no Brasil, principalmente em áreas urbanas, onde o animal invadiu parques e vive em contato estreito com a população. Além de causarem danos agrícolas, esses animais representam risco à saúde pública pela infestação de ectoparasitos e a conseqüente disseminação de zoonoses. A derrubada de mata nativa para a formação de pasto ou lavoura possibilita o aumento das populações de capivaras, o que se agrava pela ausência de predadores naturais, pelo seu hábito alimentar e pelo potencial reprodutivo (VARGAS *et al.*, 2007). Com o aparecimento de surtos de febre maculosa no país, a presença das capivaras em ambientes com grande circulação de pessoas teve importante repercussão popular. No entanto, apesar de todo o alarde resultante, ainda são raros os estudos com dados consistentes sobre o impacto das capivaras para o ambiente e para a saúde pública. Considerando esse fato e os resultados desse trabalho, percebe-se que é urgente a necessidade de pesquisas para se entender melhor as susceptibilidades à infecções e parasitoses e respectivas epidemiologias nesses animais.

Com esse trabalho também fica clara a importância do uso de ferramentas diagnósticas como auxílio na medicina veterinária. O laboratório deve complementar a clínica, pois os resultados laboratoriais fornecem informações para a definição de um diagnóstico diferencial, o monitoramento de tratamento e a formulação de um prognóstico (MEYER e HARVEY, 1998). Além de, como nesse caso, poder resultar em achados de uma enfermidade do animal que ainda não se tinha conhecimento.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, S. L. **Aspectos Epidemiológicos da Malária no Parque Nacional do Jaú, Amazonas, Brasil**. 287p. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) - Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, 2005.

AEN – Agência Estadual de Notícias. **Pesquisa sobre malária realizada no Paraná fará parte do cadastro nacional**. Disponível em: <<http://www.aenoticias.pr.gov.br>>. Acesso em: 19 abr. 2007.

BLEVINS, S. M.; GREENFIELD, R. A.; BRONZE, M. S. Blood smear analysis in babesiosis, ehrlichiosis, relapsing fever, malaria, and Chagas disease. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 75, n. 7, p. 521-530, 2008.

BRAGA, E. M.; FONTES, C. J. F. *Plasmodium* – Malária. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11^a ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 143-161.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Situação da Malária em 2007**. Abr. 2008. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br>>. Acesso em: 20 dez. 2008.

BRASIL. Secretaria de Estado da Saúde. Disponível em: <<http://www.saude.pr.gov.br>>. Acesso em: 26 fev. 2009.

CERUTTI-JÚNIOR, C.; BOULOS, M.; COUTINHO, A. F.; HATAB, M. C. L. D.; FALQUETI, A.; REZANDE, H. R.; DUARTE, A. M. R. C.; COLLINS, W.; MALAFRONT, R. S. Epidemiologic aspects of the malaria transmission cycle in an area of very low incidence in Brazil. **Malaria Journal**, v. 6, p. 33, 2007.

COWMAN, A. F.; CRABB, B. S. Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 755–766, 2006.

FALAVIGNA-GUILHERME, A. L.; SILVA, A. M.; GUILHERME, E. V.; MORAIS, D. L. Retrospective study of malaria prevalence and *Anopheles* genus in the area of influence of the binational Itaipu reservoir. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, n. 2, 2005.

FUGIKAHA, E.; FORNAZARI, P. A.; PENHALBEL, R. S. R.; LORENZETTI, A.; MAROSO, R. D.; AMORAS, J. T.; SARAIVA, A. S.; SILVA, R. U.; BONINI-DOMINGOS, C. R.; MATTOS, L. C.; ROSSIT, A. R. B.; CAVASINI, C. E.; MACHADO, R. L. D. Molecular screening of *Plasmodium* sp. asymptomatic carriers among transfusion centers from Brazilian Amazon region. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 1, 2007.

GAUR, D. D. C.; MAYER, G.; MILLER, L. H. Parasite ligand–host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. **International Journal of Parasitology**, v. 34, n. 13, p. 1413–1429, 2004.

HALDAR, K.; MOHANDAS, N. Erythrocyte remodeling by malaria parasites. **Current Opinion in Hematology**, v. 14, n. 3, p. 203-209, 2007.

HALL, N.; KARRAS, M.; RAINE, J. D.; CARLTON, J. M.; KOOIJ, T. W. A.; BERRIMAN, M.; FLORENS, L.; JANSSEN, C. S.; PAIN, A.; CHRISTOPHIDES, G. K.; JAMES, K.; RUTHERFORD, K.; HARRIS, B.; HARRIS, D.; CHURCHER, C.; QUAIL, M. A.; ORMOND, D.; DOGETT, J.; TRUEMAN, H. E.; MENDOZA, J.; BIDWELL, S. L.; RAJANDREAM, M. A.; CARUCCI, D. J.; YATES III, J. R.; KAFATOS, F. C.; JANSE, C. J.; BARRELL, B.; TURNER, C. M. R.; WATERS, A. P.; SINDEN, R. E. A Comprehensive Survey of the *Plasmodium* Life Cycle by Genomic, Transcriptomic, and Proteomic Analyses. **Science**, v. 307, p. 82-86, 2005.

HUNT, N. H.; GOLENSER, J.; CHAN-LING, T.; PAREKH, S.; RAE, C.; POTTER, S.; MEDANA, I. M.; MIU, J.; BALL, H. J. Immunopathogenesis of cerebral malaria. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 5, p. 569-582, 2006.

LANDAU, I.; GAUTRET, P. Animal Models: Rodents. In: SHERMAN, I. W. **Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis and Protection**. Washington: ASM Press, 1998. p. 401-417.

LANGE, R. R.; SCHMIDT, E. M. S. Rodentia – Roedores Silvestres (Capivara, Cutia, Paca, Ouriço). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Eds.). **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. p. 475-491.

MARQUES, A. C.; GUTIERREZ, H. C. Combate à malária no Brasil: evolução, situação atual e perspectivas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 27, p. 91-108, 1994.

PERKINS, S. L.; SARKAR, I. N.; CARTER, R. The phylogeny of rodent malaria parasites: Simultaneous analysis across three genomes. **Infections, Genetics and Evolution**, v. 7, n. 1, p. 74-83, 2007.

SAFEUKUI, I.; MILLET, P.; BOUCHER, S.; MELINARD, L.; FREGEVILLE, F.; RECEVEUR, M. C.; PISTONE, T.; FIALON, P.; VINCENDEAU, P.; FLEURY, H.; MALVY, D. Evaluation of FRET real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of *Plasmodium* species in returning travellers and migrants. **Malaria Journal**, v. 7, p. 70, 2008.

SAINSBURY, A. W. Rodentia (Rodents). In: FOWLER, M.E.; MILLER, R.E. **Zoo and Wild Animal Medicine**. 5th Ed. Saint Louis: Saunders, 2003. p. 420-442.

SANTOS, R. C. F. **Relatório de estágio curricular supervisionado: Medicina de Animais Selvagens**. 46f. Trabalho de conclusão de curso – Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007. Apresentação em PowerPoint.

SINDEN, R. E. Gametocytes and Sexual Development. In: SHERMAN, I.W. **Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis and Protection**. Washington: ASM Press, 1998. p. 25-48.

TUTEJA, R. Malaria - an overview. **The FEBS Journal**, v. 274, n. 18, p. 4670-4679, 2007.

VALKIUNAS, G. **Avian malaria parasites and other Haemosporidia**. Boca Raton: CRC Press, 2005. 935p.

VARGAS, F. C.; VARGAS, S. C.; MORO, M. E. G.; SILVA, V.; CARRER, C. R. O. Monitoramento populacional de capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris* Linnaeus, 1766) em Pirassununga, SP, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1104-1108, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **World Malaria Situation in 2005**.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **World Malaria Report 2008**.

APÊNDICE

VALORES DOS HEMOGRAMAS ESPECIFICADOS POR ANIMAL

TABELA 1 – RESULTADOS DOS HEMOGRAMAS DE 10 CAPIVARAS (*Hydrochaeris hydrochaeris*) DE CATIVEIRO DO REFÚGIO BIOLÓGICO BELA VISTA, ITAIPU BINACIONAL, FOZ DO IGUAÇU, PR

Animal	Sexo	Identificação	Hem (x10 ⁶ /ul)	Ht (%)	Hb (g/dl)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (%)	Leuc (/ul)	Neutr (%)	Neutr (/ul)	Linf (%)	Linf (/ul)	Mono (%)	Mono (/ul)	Eos (%)	Eos (/ul)	PPT (g/dl)
1	F	Zoo 005	3,57	42	13,16	117,65	36,86	31,33	4.650	59	2.744	36	1.674	5	233	0	0	8,2
2	M	Casib 2355	3,69	48	14,76	130,08	40,00	30,75	3.600	41	1.476	49	1.764	10	360	0	0	7,6
3	F	Zoo 009	3,84	45	14,33	117,19	37,32	31,84	6.100	43	2.623	48	2.928	5	305	4	244	7,6
4 (+)	F	Zoo 011	4,07	45	13,94	110,57	34,25	30,98	9.600	58	5.568	36	3.456	6	576	0	0	7,4
5	F	Zoo 010	4,28	44	13,90	102,80	32,48	31,59	6.700	74	4.958	25	1.675	1	67	0	0	7,4
6	F	Zoo 203	3,30	42	13,29	127,27	40,27	31,64	3.750	58	2.175	41	1.538	1	38	0	0	7,6
7 (+)	M	Zoo 004	4,02	42	13,53	104,48	33,66	32,21	2.800	63	1.764	33	924	2	56	0	0	8,2
8	F	Casib 2353	3,53	48	16,46	135,98	46,63	34,29	4.650	44	2.046	43	2.000	13	605	0	0	7,6
9 (+)	F	Casib 2354	3,58	41	12,46	114,53	34,80	30,39	6.500	60	3.900	32	2.080	7	455	1	65	7
10	M	Zoo 182	2,74	38	13,47	138,69	49,16	35,45	3.900	35	1.365	57	2.223	8	312	0	0	7,6
Média			3,66	43,5	13,93	119,92	38,54	32,04	5.225	53,5	2.861,9	40	2.026,2	5,8	300,7	0,5	30,9	7,62
Desvio			0,44	3,13	1,09	12,6	5,58	1,60	2.022,68	12,12	1.467	9,51	720,28	3,9	206,54	1,27	77,61	0,36

NOTA: (+): Animais positivos para *Plasmodium* sp.

F: fêmeas. M: machos

Hem: hemácias. Ht: hematócrito. Hb: hemoglobina. Neutr: neutrófilos. Linf: linfócitos. Mono: monócitos. Eos: eosinófilo. PPT: proteína plasmática total

TABELA 2 – RESULTADOS DOS HEMOGRAMAS DE 21 CAPIVARAS DE VIDA LIVRE DA ITAIPU BINACIONAL, FOZ DO IGUAÇU, PR

Animal	Idade	Sexo	Hem (x10 ⁶ /ul)	Ht (%)	Hb (g/dl)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (%)	Leuc (/ul)	Neutr (%)	Neutr (/ul)	Linf (%)	Linf (/ul)	Mono (%)	Mono (/ul)	Eos (%)	Eos (/ul)	Basof (%)	Basof (/ul)	PPT (g/dl)
11 (ag/2007)	A	F	2,86	45	11,49	157,34	40,17	25,53	3.700	49	1813	37	1369	14	518	0	0	0	0	7,8
1*	J	M	1,91	26	7,82	136,13	40,94	30,08	11.500	15	1.725	63	7.245	16	1.840	2	230	4	69	10,4
2*	J	F	2,45	37	10,40	151,02	42,45	28,11	9.600	17	1.632	76	7.296	7	672	0	0	0	0	7,6
3*	F	F	2,47	41	12,72	165,99	51,50	31,02	13.750	12	1.650	79	10.863	8	1.100	1	137,5	0	0	6,8
4*	F	F	3,10	46	13,36	148,39	43,10	29,04	12.250	21	2.573	70	8.575	6	735	3	367,5	0	0	7,2
1	A	F	2,18	36	12,18	165,14	55,87	33,83	8.250	50	4.125	33	2.723	11	908	3	247,5	3	123,75	7
2	A	M	3,25	41	13,67	126,15	42,06	33,34	10.450	50	5.225	35	3.658	5	523	8	836	2	104,5	8
3	A	F	3,07	37	12,43	120,52	40,49	33,59	7.200	44	3.168	44	3.168	5	360	4	288	1	31,68	8
4	J	F	2,51	36	12,87	143,43	51,27	35,75	11.050	27	2.984	64	7.072	2	221	6	663	1	29,835	7
5	A	F	3,47	41	14,39	118,16	41,47	35,10	9.350	45	4.208	42	3.927	12	1.122	0	0	1	42,075	7
6	J	F	2,59	41	13,62	158,30	52,59	33,22	7.650	28	2.142	60	4.590	6	459	2	153	2	42,84	6,2
7	F	F	2,69	41	13,68	152,42	50,86	33,37	11.250	33	3.713	51	5.738	12	1.350	3	337,5	1	37,125	6,4
8	F	M	3,03	41	13,91	135,31	45,91	33,93	10.550	34	3.587	33	3.482	23	2.427	8	844	2	71,74	6,8
9	F	M	2,60	37	12,02	142,31	46,23	32,49	10.050	20	2.010	63	6.332	6	603	9	904,5	2	40,2	6,2
10	F	F	2,91	44	15,12	151,20	51,96	34,36	12.050	18	2.169	70	8.435	9	1.085	2	241	1	21,69	6
11	J	F	2,83	37	12,49	130,74	44,13	33,76	10.350	26	2.691	57	5.900	14	1.449	3	310,5	0	0	6,2
12	F	M	NR	44	NR	NR	NR	NR	NR	21	NR	62	NR	8	NR	5	NR	4	NR	6,8
13	F	M	2,69	38	12,30	141,26	45,72	32,37	8.400	14	1.176	69	5.796	16	1.344	0	0	1	11,76	6,4
14	J	F	2,95	42	14,12	142,37	47,86	33,62	11.250	36	4.050	46	5175	8	900	8	900	2	81	6,6
15	J	F	2,85	35	11,84	122,81	41,54	33,83	15.000	17	2.550	56	8.400	20	3.000	6	900	1	25,5	6,6
16	J	M	NR	34	NR	NR	NR	NR	NR	14	NR	75	NR	8	NR	1	NR	2	NR	6
Média			2,75	39,04	12,65	142,57	46,11	32,43	10.192,11	28,14	2.799,53	56,43	5.776	10,28	1.085,05	3,52	387,37	1,43	38,56	7
Desvio			0,37	4,54	1,63	14,49	4,9	2,58	2.516,52	13,05	1.101,47	14,81	2.410,87	5,33	714,99	2,96	340	1,2	36,67	0,99

NOTA: F: fêmeas. M: machos. A: adultos. J: jovens. F: filhotes

NR: não realizado

Hem: hemácias. Ht: hematócrito. Hb: hemoglobina. Neutr: neutrófilos. Linf: linfócitos. Mono: monócitos. Eos: eosinófilo. PPT: proteína plasmática total. Basof: basófilos

ANEXOS

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	108
ANEXO 2 – AUTORIZAÇÃO DO IBAMA	109
ANEXO 3 – IMAGENS AÉREAS DO REFÚGIO BIOLÓGICO BELA VISTA E DO LOCAL DE CAPTURA DAS CAPIVARAS DE VIDA LIVRE	112
ANEXO 4 – ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS DE <i>ssrRNA</i> DE ALGUMAS ESPÉCIES DE <i>Plasmodium</i> , COM INDICAÇÃO DOS SÍTIOS DE ANELAMENTO DOS <i>PRIMERS</i>	114
ANEXO 5 – ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS DE <i>ssrRNA</i> DAS ESPÉCIES DE <i>Plasmodium</i> DESCRITAS NO QUADRO 9 (ITEM 4.3.3).....	120
ANEXO 6 – QUADRO DAS SIMILARIDADES (EM %) ENTRE SEQUÊNCIAS DE <i>ssrRNA</i> DAS ESPÉCIES DE <i>Plasmodium</i> DESCRITAS NO QUADRO 9 (ITEM 4.3.3)	122

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Agrárias
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA SCA

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo no. 009/2008, referente ao projeto "Capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) como reservatórios da malária (*Plasmodium sp*): diagnóstico microscópico e molecular", sob a responsabilidade de Sandra Mara Rotter Curotto, na forma em que foi apresentado, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias, em reunião realizada dia 07 de maio de 2008. Este certificado expira em 31 de agosto de 2009.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 009/2008, regarding the project "Capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) as reservoirs of malaria (*Plasmodium sp*): microscopic and molecular diagnosis", in charge of Sandra Mara Rotter Curotto in the terms it was presented, was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Universidade Federal do Paraná (Federal University of the State of Parana, Southern Brazil) during session on may 07, 2008. This certificate expires on august, 2009.

Curitiba, 11 de agosto de 2008



Rogério Ribas Lange
Presidente



Fabiano Montiani-Ferreira
Vice-Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais
Setor de Ciências Agrárias
Universidade Federal do Paraná

ANEXO 2 – AUTORIZAÇÃO DO IBAMA



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 12587-1	Data da Emissão: 19/02/2008 16:48	Data de Validade: 18/02/2009
Dados do titular		
Registro no Ibama: 2083055	Nome: Wanderlei de Moraes	CPF: 010.992.048-10
Título do Projeto: Levantamento Sanitário em capivaras (<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i>) em vida livre, nas Áreas Protegidas da Itaipu Binacional		
Nome da Instituição : Itaipu Binacional		CNPJ: 00.395.988/0012-98

Observações, ressalvas e condicionantes

1	A participação do(a) pesquisador(a) estrangeiro(a) nas atividades previstas nesta autorização depende de autorização expedida pelo Ministério de Ciência e Tecnologia (CNPq/MCT);
2	Esta autorização não exime o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado exclusivamente para atividades didáticas ou científicas sem potencial de uso econômico.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br/cites . Em caso de material consignado, consulte www.ibama.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa a obtenção de autorização de acesso ao componente do patrimônio genético ou ao conhecimento tradicional associado nos termos da legislação vigente.
7	Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Federal, o pesquisador titular deverá contactar a administração dessa unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Sandra Mara Rotter Curotto	Pesquisadora	039.502.749-79	75808844 ssp-PR	Brasileira
2	Leonilda Correia dos Santos	pesquisadora	338.176.509-49	1.082.900 I.I.PR-PR	Brasileira
3	Alexander Welker Blundo	pesquisador	104.159.508-56	172734617 II-SP	Brasileira
4	ZALMIR SILVINO CUBAS	pesquisador	519.550.249-87	3.187.774-1 IIPR-PR	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	FOZ DO IGUAÇU	PR	Áreas Protegidas da Itaipu Binacional	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i>
2	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i>
3	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i>
4	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i> ("Qtde: 50)
5	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i>
6	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i>

* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Pêlo, Urina, Ectoparasita, Sangue, Fezes
2	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Outros métodos de captura/coleta (curral), Captura manual, Puçá, Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman")
3	Método de marcação (Outros mamíferos)	Descoloração de pêlos, Tatuagem (tinta), Marcação australiana (picote na orelha)

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. . Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 17427596

Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 12587-1	Data da Emissão: 19/02/2008 16:48	Data de Validade: 18/02/2009
------------------------	--	-------------------------------------

Dados do titular

Registro no Ibama: 2083055	Nome: Wanderlei de Moraes	CPF: 010.992.048-10
Título do Projeto: Levantamento Sanitário em capivaras (<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i>) em vida livre, nas Áreas Protegidas da Itaipu Binacional		
Nome da Instituição : Itaipu Binacional		CNPJ: 00.395.988/0012-98

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Itaipu Binacional	Hospital Veterinário da Itaipu Binacional
2	Itaipu Binacional	Laboratório Ambiental da Itaipu Binacional
3	UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	Entidade de Ensino Superior

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. . Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 17427596

Página 2/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 12587-1	Data da Emissão: 19/02/2008 16:48	Data de Validade: 18/02/2009
Dados do titular		
Registro no Ibama: 2083055	Nome: Wanderlei de Moraes	CPF: 010.992.048-10
Título do Projeto: Levantamento Sanitário em capivaras (<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i>) em vida livre, nas Áreas Protegidas da Itaipu Binacional		
Nome da Instituição: Itaipu Binacional		CNPJ: 00.395.988/0012-98

Anexo para registrar Coletas Imprevistas de Material Biológico

De acordo com a Instrução Normativa Ibama nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta ser comunicada ao Ibama por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica, preferencialmente depositado em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Nível	Táxon*	Qtde.	Amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico mais específico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. . Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 17427596

Página 3/3

ANEXO 3 – IMAGENS AÉREAS DO REFÚGIO BIOLÓGICO BELA VISTA E
DO LOCAL DE CAPTURA DAS CAPIVARAS DE VIDA LIVRE

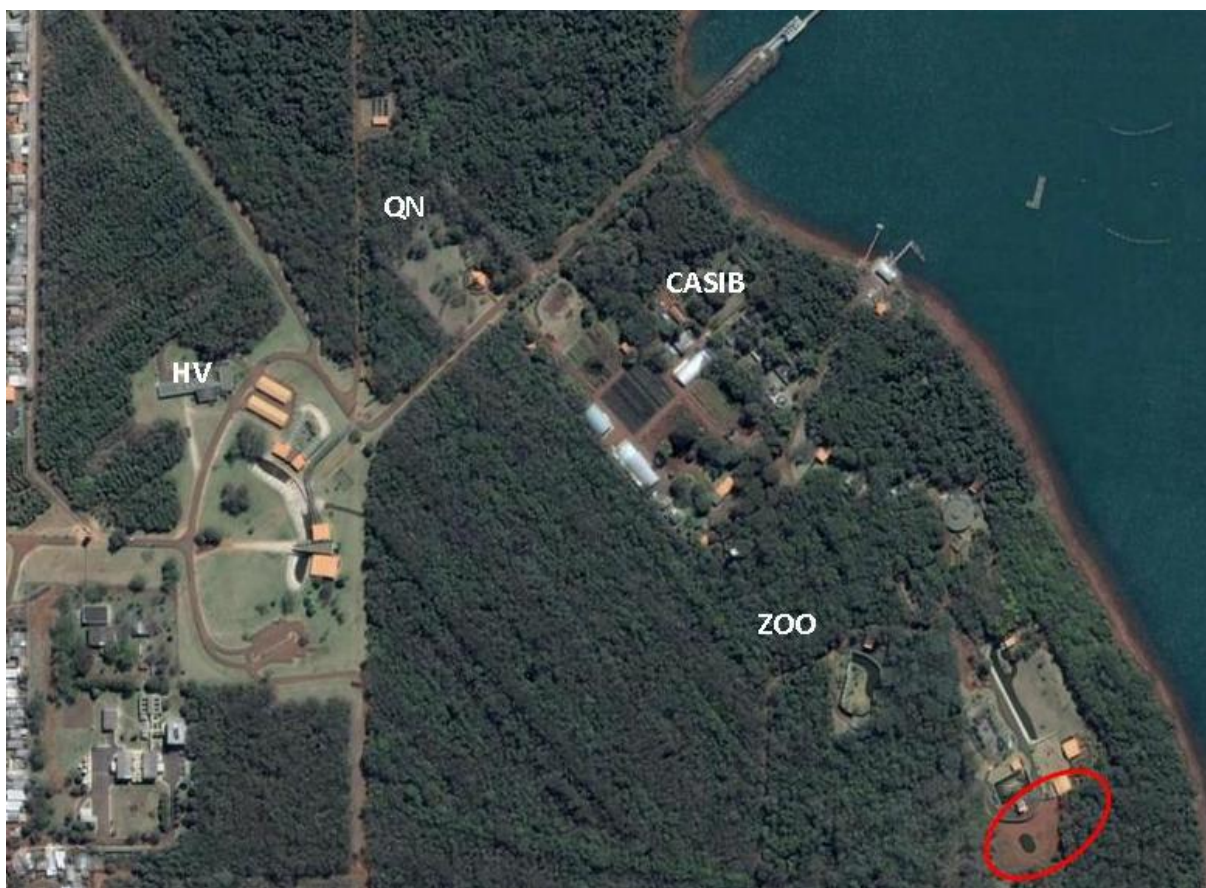


FIGURA 1 – FOTO AÉREA DA ÁREA CONSTRUÍDA DO REFÚGIO BIOLÓGICO BELA VISTA

FONTE: Adaptado de SANTOS (2007)

NOTA: HV: Hospital Veterinário; QN: quarentenário; CASIB: Criadouro de Animais Selvagens da Itaipu Binacional; ZOO: Zoológico Roberto Ribas Lange. Área em destaque: Recinto das capivaras, catetos e antas



FIGURA 2 – FOTO AÉREA DO LAGO DA PIRACEMA

FONTE: <<http://wikimapia.org/>>

NOTA Área em destaque: Local da construção do recinto de captura

ANEXO 4 – ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS DE *ssrRNA* DE ALGUMAS ESPÉCIES DE *Plasmodium*, COM INDICAÇÃO DOS SÍTIOS DE ANELAMENTO DOS PRIMERS

Primers PCR A:

reação 1:

Anverso: rPLU1 TCA AAG ATT AAG CCA TGC AAG TGA [37-61]
Reverso: rPLU6R CGT TTT AAC TGC AAC AAT TTT AA [638-660]

reação 2:

Anverso: rPLU3 TTT TTA TAA GGA TAA CTA CGG AAA AGC TGT [133-163]
Reverso: rPLU4 TAC CCG TCA TAG CCA TGT TAG GCC AAT ACC [362-391]

Primers PCR B:

reação 1:

Anverso: rPLU1 TCA AAG ATT AAG CCA TGC AAG TGA [37-61]
Reverso: rPLU7R GCA CCA GAC TTG CCC TCC A [583-601]

reação 2:

Anverso: rPLU3b ATG TAG AAA CTG CGA ACG GCT C [81-102]
Reverso: rPLU4b TCA TAG CCA TGT TAG GCC AAT ACC [362-385]

Alignment: E:\plasmodium 18S small subunit ribossomal RNA gene

	5	15	25	35
P. malaria	AACCTGGTTG	ATCTTGCCAG	TAGTCATATG	CTTGTC TCAA
P. vivax	-----	-----	-----	-----
P. ovale	AACCTGGTTG	ATCTTGCCAG	TAGTCATATG	CTTGTC TCAA
P. reicheno	AACCTGGTTG	ATCTTGCCAG	TAGTCATATG	CTTGTC TCAA
P. fragile	-ACCTGGTTG	ATCTTGCCAG	TAGTCATATG	CCTGTC TCAA
P. knowles	-----	-----	-----	-----
P. cynomol	AACCTGGTTG	ATCTTGCCAG	TAGTCATATG	CTTGTC TCAA
P. simium	-----	-----	-----	-----
P. berghei	AACCTGGTTG	ATCTTGCCAG	TAGTCATATG	CTTGTC TCAA
P. yoelii	-ACCTGGTTG	ATCTTGCCAG	TAGTCATATG	CTTGTC TCAA
P. chabaud	AACCTGGTTG	ATCTTGCCAG	TAGTCATATG	CTTGTC TCAA
P. gallinac	AACCTGGTTG	ATCTTGCCAG	TAGTCATATG	CTTGTC TCAA
P. lophura	AACCTGGTTG	ATCTTGCCAG	TAGTCATATG	CTTGTC TAAA
P. catheme	AACCTGGTTG	ATCTTGCCAG	TAGTCATATG	CTTGTC TCAA
Unidentifi	-----	-----	-----	-----
Unidentifi	-----	-----	-----	-----

	45	55	65	75
P. malaria	AGATTAA-GC	CATGCAAGTG	AAAGTATATG	CATATTTTAT
P. vivax	-----	-----	-----	-----
P. ovale	AGATTAA-GC	CATGCAAGTG	AAAGTATATG	CATATTTTAT
P. reicheno	AGATTAA-GC	CATGCAAGTG	AAAGTATATA	TATATTTTAT
P. fragile	AGATTAAAGC	CATGCAAGTG	AAAGTATATG	CATATTTTAT
P. knowles	-----	-----	-----	-----
P. cynomol	AGATTAA-GC	CATGCAAGTG	AAAGTATATG	CATATTTTAT
P. simium	-----	-----	-----	-----
P. berghei	AGATTAA-GC	CATGCAAGTG	AAAGTATATG	CATATTTTAT
P. yoelii	AGATTAA-GC	CATGCAAGTG	AAAGTATATG	CATATTTTAT
P. chabaud	AGATTAA-GC	CATGCAAGTG	AAAGTATATG	CATATTTTAT
P. gallinac	AGATTAA-GC	CATGCAAGTG	AAAGTATATA	TATATTTATT

P. lophura	AGATTAA-GC	CATGCAAGTG	AAAGTATATA	TATATTTATT
P. catheme	AGATTAA-GC	CATGCAAGTG	AAAGTATATA	TATATTTAAT
Unidentifi	-----	-----	-----	-----
Unidentifi	-----	-----	-----	-----

	85	95	105	115
P. malaria	ATGTAGAAAC	TGCGAACGGC	TCATTAAAAAC	AGTTATAGTC
P. vivax	-----	-----	-----	-----
P. ovale	ATGTAGAAAC	TGCGAACGGC	TCATTAAAAAC	AGTTATAATC
P.reichenho	ATGTAGAAAC	TGCGAACGGC	TCATTAAAAAC	AGTTATAGTC
P. fragile	ATGTAGAAAC	TGCGAACGGC	TCATTAAAAAC	AGTTATAATC
P. knowles	-----	-----	-----	-----
P. cynomol	ATGTAGAAAC	TGCGAACGGC	TCATTAAAAAC	AGTTATAATC
P. simium	-----	-----	-----	-----
P.berghei	ATGTAGAAAC	TGCGAACGGC	TCATTAAAAAC	AGTTATAATC
P. yoelii	ATGTAGAAAC	TGCGAACGGC	TCATTAAAAAC	AGTTATAATC
P. chabaud	ATGTAGAAAC	TGCGAACGGC	TCATTAAAAAC	AGTTATAATC
P.gallinac	ATATAGAAAC	TGCGAACGGC	TCATTAAAAAC	AGTTATAATC
P. lophura	ATATAGAAAC	TGCGAACGGC	TCATTAAAAAC	AGTTATAATC
P. catheme	ATATAGAAAC	TGCGAACGGC	TCATTAAAAAC	AGTTATAATC
Unidentifi	-----	-----	-----	-----
Unidentifi	-----	-----	-----	-----

	125	135	145	155
P. malaria	TACTTGACAT	TTTT-TTTAT	AAGGATAACT	ACGGAAAAGC
P. vivax	-----	--TT-TTTAT	AAGGATAACT	ACGGAAAAGC
P. ovale	TACTTGACAT	TTTACTTTAC	AAGGATAACT	ACGGAAAAGC
P.reichenho	TACTTGACAT	TTTT-ATTAT	AAGGATAACT	ACGGAAAAGC
P. fragile	TACTTGACAT	TTTC-TATAT	AAGGATAACT	ACGGAAAAGC
P. knowles	-----	-----	-----	-----
P. cynomol	TACTTGACAT	TTTT-TCTAT	AAGGATAACT	ACGGAAAAGC
P. simium	-----	--GGATAACT	ACGGAAAAGC	-----
P.berghei	TACTTGACAT	TTTA--TTAT	AAGGATAACT	ACGGAAAAGC
P. yoelii	TACTTGACAT	TTTA--TTAT	AAGGATAACT	ACGGAAAAGC
P. chabaud	TACTTGACAT	TTTA--TTAT	AAGGATAACT	ACGGAAAAGC
P.gallinac	TACTTGACAT	TTTT-TTTAT	AAGGATAACT	ACGGAAAAGC
P. lophura	TACTTGACAT	TTTT-TT-AT	AAGGATAACT	ACGGAAAAGC
P. catheme	TACTTGACAT	TTTT-TTCAT	AAGGATAACT	ACGGAAAATC
Unidentifi	-----	-----	-----	----TAATAC
Unidentifi	-----	-----	-----	----TAATAC

	165	175	185	195
P. malaria	TGTAGCTAAT	ACTTGCTTTA	A-TACTCTTA	ATTCT-----
P. vivax	TGTAGCTAAT	ACTTGCTTTA	A-TGCTCCAG	ACGT-----
P. ovale	TGTAGCTAAT	ACTTGCTTTA	A-TGCGTTTG	ATTCA-----
P.reichenho	TGTAGCTAAT	ACTTGCTTTA	TTATCCTTTG	AT-----
P. fragile	TGTAGCTAAT	ACTTGCTTTA	G-CACTCTTG	AT-----
P. knowles	-----	-----CTTTA	G-CACTCTTG	AT-----
P. cynomol	TGTAGCTAAT	ACTTGCTTTA	G-CACTCTTG	AT-----
P. simium	TGTAGCTAAT	ACTTGCTTTA	A-TGCTCCCG	ACGT-----
P.berghei	TGTAGCTAAT	ACTTGCTTTA	AGTGCTTTTT	ACTT-----
P. yoelii	TGTAGCTAAT	ACTTGCTTTA	AGTGCTTTTT	ACTC-----
P. chabaud	TGTAGCTAAT	ACTTGCTTTA	ATTGCTTTT-	ACTC-----
P.gallinac	TGTAGCTAAT	ACTTGACCGA	T-TGTTCCCTC	A-TCGCCTTT
P. lophura	TGTAGCTAAT	ACTTGATCGA	T-T-TTCTTC	AAAACCCCAA
P. catheme	TGTAGCTAAT	ACTTGAACGA	T-TGTTTTTC	AGTTCCCCAA
Unidentifi	TTGAACGAAT	ATTTATTATA	TTTACTAGCG	TTAAACTA-
Unidentifi	TTGCTCGA--	-TTTGACTG	CTAACTGGTG	GT-----

 205 215 225 235
P. malaria	TTTATGTTTT	TTGAGTATGT	ATTTGTTAAG	CCTTATAAG-
P. vivax	GTTACGTCTT	GTGAGCATGT	ACTTGTTAAG	CCTTT-ATAA
P. ovale	TTTTTGTGTC	TTACGTATGT	ACTTGTTAAG	CCTTT-AAG-
P.reichen	TTTATATCTT	A-GGATAAGT	ACTTGTTAGG	CCTT--ATAA
P. fragile	-TTATTTCTT	G--AGTGTGT	ACTTGTTAAG	CCTT--ATAA
P. knowles	-TTATTTCTT	G--AGTGTGT	ACTTGTTAAG	CCTT--ATAA
P. cynomol	-TAACTTCTT	G--AGTGTGT	ACTCGTTAAG	CCTT--TTAA
P. simium	GTTACGTCTT	GTGAGCATGT	ACTTGTTAAG	CCTTT-ATAA
P.berghei	-CTTGAGTA	ATTAGCATGT	ATTTGTTAAG	CCTT--ATA-
P. yoelii	-TCCGGAGTA	ATTAGCATGT	ATTTGTTAAG	CCTT--ATA-
P. chabaud	-CCCGAGATA	-TTTGCATGT	ATTTGTTAAG	CCTT--ATA-
P.gallinac	ATAGGTAATG	AAGAACACGT	ATTTGTTAAG	CCTT--ATAA
P. lophura	AAAGGTTCTG	TTGAACACGT	ATTTGTTAAG	CCTT--ATAA
P. catheme	AAAGGTTCTG	AAAAACACGT	ATTTGTTAAG	CCTT--ATAA
Unidentifi	GTAAA-AATA	ATAAATATGT	ATCTGTTAAG	CCTT--ATAA
Unidentifi	GTTAG-ACAG	ATTTACAGGT	ATTTGTTAGG	GTTG--AAAA
 245 255 265 275
P. malaria	--AGAAAAGT	ATATTTAACTT	AAGGAAT-AT	AACAAAGAAG
P. vivax	--GAAAAAAG	TTAATAACTT	AAGGAATGAT	AACAAAGAAG
P. ovale	--AGAAAAGT	TT-ACAACTT	AAGGAATTAT	AACAAAGAAG
P.reichen	--GAAAAAAG	TTATTTAACTT	AAGGAATTAT	AACAAAGAAG
P. fragile	--GAAAGAAG	TTATTTAACTT	AAGGAATTAT	AACAAAGAAG
P. knowles	--GAAAGAAG	TTATTTAACTT	AAGGAATTAT	AACAAAGAAG
P. cynomol	--GAAAAAAG	TTATTTAACTT	AAGGAATTAT	AACAAAGAAG
P. simium	--GAAAAAAG	TTAATAACTT	AAGGAATGAT	AACAAAGAAG
P.berghei	--AGAAAAAT	TT-TTAATTA	AAGGAATTAT	AACAAAGAAG
P. yoelii	--AGAAAAAT	TT-TTAATTA	AAGGAATTAT	AACAAAGAAG
P. chabaud	--AGAAAAAT	TT-TTAATTG	AAGGAATTAT	AACAAAGAAG
P.gallinac	--GAAAAAAG	TTATTTAATTT	AAGGAATTAT	AACAAAGAAG
P. lophura	--GAAAAAAG	TTACTAACTA	AAGGAATTAT	AACAAAGAAG
P. catheme	--GAAAAAAG	TTATTTAACTT	AAGGAATTAT	AACAAAGAAG
Unidentifi	--AAAGATAG	TTTAAATTA-	AAGGAATTAT	AACAAAGAAG
Unidentifi	GGAAAGGTGC	ATAATAACAC	AAGGAGTGAT	AACAAAGAAA
 285 295 305 315
P. malaria	TAACACAT--	AATA--AATT	TC-GATTTAT	TT--AGTGTG
P. vivax	TGACACATAA	AAAG--GACT	CGTCCCATT	TCT-AGTGTG
P. ovale	TAACACAT--	AATA--AGTT	T--ACCTTAT	TT--AGTGTG
P.reichen	TAACACGT--	AATA--AATT	T--ATTTTAT	TT--AGTGTG
P. fragile	TAACACGTGA	AATG--GATT	AACTCCATT	TTTTAGTGTG
P. knowles	TAACACGT--	AATG--GATT	A-TTCCATT	TTT-AGTGTG
P. cynomol	TAACACGT--	AATG--GATC	C-GTCCATT	TT--AGTGTG
P. simium	TGACACATAA	AAAG--GACT	CGTCCCATT	TCT-AGTGTG
P.berghei	TAACACAT--	AATA--TATT	T--ACTATAT	TT--AGTGTG
P. yoelii	TAACACAT--	AATA--TATT	T--ATTATAT	TT--AGTGTG
P. chabaud	TAACACAT--	AATA--TATT	T--ACTATAT	TT--AGTGTG
P.gallinac	CAACACAT--	AATA--AAAC	TTTGTTTTAT	TT--AGTGTG
P. lophura	CAACACAT--	AATA--AAGC	TGCGTCTTAT	TT--AGTGTG
P. catheme	GAACACAT--	AATG--GAAC	TCCGTTTCAT	TT--AGTGTG
Unidentifi	TAACACGT--	AATA--AAT	TATATTT-AT	TA--AGTGTG
Unidentifi	CAACACGT--	-ATAA--ATA	TTTATTTTAT	TA--AGTGTG

	325	335	345	355
P. malaria	TATCAATCGA	GTTTCTGACC	TATCAGCTTT	TGA-TGTTA-
P. vivax	TATCAATCGA	GTTTCTGACC	TATCAGCTTT	TGA-TGTTA-
P. ovale	TATCAATCGA	GTTTCTGACC	TATCAGCTTT	TGA-TGTTA-
P.reichen	TATCAATCGA	GTTTCTGACC	TATCAGCTTT	TGA-TGTTA-
P. fragile	TATCAATCGA	GTTTCTGACC	TATCAGCTTT	TGA-TGTTAC
P. knowles	TATCAATCGA	GTTTCTGACC	TATCAGCTTT	TGA-TGTTA-
P. cynomol	TATCAATCGA	GTTTCTGACC	TATCAGCTTT	TGA-TGTTA-
P. simium	TATCAATCGA	GTTTCTGACC	TATCAGCTTT	TGAATGTTA-
P.berghei	TATCAATCGA	GTTTCTGACC	TATCAGCTTT	TGA-TGTTA-
P. yoelii	TATCAATCGA	GTTTCTGACC	TATCAGCTTT	TGA-TGTTA-
P. chabaud	TATCAATCGA	GTTTCTGACC	TATCAGCTTT	TGA-TGTTA-
P.gallinac	TATCAATCGA	GTTTCTGACC	TATCAGCTTT	TGA-TGTTA-
P. lophura	TATCAATCGA	GTTTCTGACC	TATCAGCTTT	TGA-TGTTA-
P. catheme	TATCAATCGA	GTTTCTGACC	TATCAGCTTT	TGA-TGTTA-
Unidentifi	TATCAATCGA	GTTTCTGACC	TATCAGCTTT	TGA-TGTTA-
Unidentifi	TATCAATCGA	GTTTCTGACC	TATCAGCTTT	TGA-TGTTA-

	365	375	385	395
P. malaria	GGGTATTGGC	CTAACATGGC	TATGACGGGT	AACGGGGAAT
P. vivax	GGGTATTGGC	CTAACATGGC	TATGACGGGT	AACGGGGAAT
P. ovale	GGGTATTGGC	CTAACATGGC	TATGACGGGT	AACGGGGAAT
P.reichen	GGGTATTGGC	CTAACATGGC	TATGACGGGT	AACGGGGAAT
P. fragile	GGGTATTGGC	CTAACATGGC	TATGACGGGT	AACGGGGAAT
P. knowles	GGGTATTGGC	CTAACATGGC	TATGACGGGT	AACGGGGAAT
P. cynomol	GGGTATTGGC	CTAACATGGC	TATGACGGGT	AACGGGGAAT
P. simium	GGGTAT-GGC	CTAACATGGC	TATGACGGGT	AACGGGGAAT
P.berghei	GGGTATTGGC	CTAACATGGC	TATGACGGGT	AACGGGGAAT
P. yoelii	GGGTATTGGC	CTAACATGGC	TATGACGGGT	AACGGGGGAA
P. chabaud	GGGTATTGGC	CTAACATGGC	TATGACGGGT	AACGGGGAAT
P.gallinac	GGGTATTGGC	CTAACATGGC	TATGACGGGT	AACGGGGAAT
P. lophura	GGGTATTGGC	CTAACATGGC	TATGACGGGT	AACGGGGAAT
P. catheme	GGGTATTGGC	CTAACATGGC	TATGACGGGT	AACGGGGAAT
Unidentifi	GGGTATTGGC	CTAACATGGC	TATGACGGGT	AACGGGGAAT
Unidentifi	GGGTATTGGC	CTAACATGGC	TATGACGGGT	AACGGGGAAT

	405	415	425	435
P. malaria	TAGAGTTCGA	TTC--CGGAG	AGGGAGCCTG	AGAAATAGCT
P. vivax	TAGAGTTCGA	TTC--CGGAG	AGGGAGCCTG	AGAAATAGCT
P. ovale	TAGAGTTCGA	TTC--CGGAG	AGGGAGCCTG	AGAAATAGCT
P.reichen	TAGAGTTCGA	TTC--CGGAG	AGGGAGCCTG	AGAAATAGCT
P. fragile	TAGAGTTCGA	TTC--CGGAG	AGGGAGCCTG	AGAAATAGCT
P. knowles	TAGAGTTCGA	TTC--CGGAG	AGGGAGCCTG	AGAAATAGCT
P. cynomol	TAGAGTTCGA	TTC--CGGAG	AGGGAGCCTG	AGAAATAGCT
P. simium	TAGAGTTCGA	TTCTCCGGAG	AGGGAGCCTG	AGAAATAGCT
P.berghei	TAGAGTTCGA	TTC--CGGAG	AGGGAGCCTG	AGAAATAGCT
P. yoelii	TTAGATTTCGA	TTC--CGGAG	AGGGAGCCTG	AGAAATAGCT
P. chabaud	TAGAGTTCGA	TTC--CGGAG	AGGGAGCCTG	AGAAATAGCT
P.gallinac	TAGAGTTCGA	TTC--CGGAG	AGGGAGCCTG	AGAAATAGCT
P. lophura	TAGAGTTCGA	TTC--CGGAG	AGGGAGCCTG	AGAAATAGCT
P. catheme	TAGAGTTCGA	TTC--CGGAG	AGGGAGCCTG	AGAAATAGCT
Unidentifi	TAGAGTTCGA	TTC--CGGAG	AGGGAGCCTG	AGGAATAGCT
Unidentifi	TAGAGTTCGA	TTC--CGGAG	AGGGAGCCTG	AGAAATAGCT

 445 455 465 475
P. malaria	ACCACATCTA	AGGAAGGCAG	CAGGCGCGTA	AATTACCCAA
P. vivax	ACCACATCTA	AGGAAGGCAG	CAGGCGCGTA	AATTACCCAA
P. ovale	ACCACATCTA	AGGAAGGCAG	CAGGCGCGTA	AATTACCCAA
P.reichen	ACCACATCTA	AGGAAGGCAG	CAGGCGCGTA	AATTACCCAA
P. fragile	ACCACATCTA	AGGAAGGCAG	CAGGCGCGTA	AATTACCCAA
P. knowles	ACCACATCTA	AGGAAGGCAG	CAGGCGCGTA	AATTACCCAA
P. cynomol	ACCACATCTA	AGGAAGGCAG	CAGGCGCGTA	AATTACCCAA
P. simium	ACCACATCTA	AGGAAGGCAG	CAGGCGCGTA	AATTACCCAA
P.berghei	ACCACATCTA	AGGAAGGCAG	CAGGCGCGTA	AATTACCCAA
P. yoelii	ACCACATCTA	AGGAAGGCAG	CAGGCGCGTA	AATTACCCAA
P. chabaud	ACCACATCTA	AGGAAGGCAG	CAGGCGCGTA	AATTACCCAA
P.gallinac	ACCACATCTA	AGGAAGGCAG	CAGGCGCGTA	AATTACCCAA
P. lophura	ACCACATCTA	AGGAAGGCAG	CAGGCGCGTA	AATTACCCAA
P. catheme	ACCACATCTA	AGGAAGGCAG	CAGGCGCGTA	AATTACCCAA
Unidentifi	ACCACATCTA	AGGAAGGCAG	CAGGCGCGTA	AATTACCCAA
Unidentifi	ACCACATCTA	AGGAAGGCAG	CAGGCGCGTA	AATTACCCAA
 485 495 505 515
P. malaria	TTCTAAAGAA	GAGAGGTAGT	GACAAGAAAT	AACAATGCAA
P. vivax	TTCTAAAGAA	GAGAGGTAGT	GACAAGAAAT	AACAATACAA
P. ovale	TTCTAAAGAA	GAGAGGTAGT	GACAAGAAAT	AACAATACAA
P.reichen	TTCTAAAGAA	GAGAGGTAGT	GACAAGAAAT	AACAATGCAA
P. fragile	TTCTAAAGAA	GAGAGGTAGT	GACAAGAAAT	AACAATACAA
P. knowles	TTCTAAAGAA	GAGAGGTAGT	GACAAGAAAT	AACAATACAA
P. cynomol	TTCTAAAGAA	GAGAGGTAGT	GACAAGAAAT	AACAAT-CAA
P. simium	TTCTAAAGAA	GAGAGGTAGT	GACAAGAAAT	AACGATACAA
P.berghei	TTCTAAATAA	GAGAGGTAGT	GACAAGAAAT	AACAATATAA
P. yoelii	TTCTAAATAA	GAGAGGTAGT	GACAAGAAAT	AACAATATAA
P. chabaud	TTCTAAATAA	GAGAGGTAGT	GACAAGAAAT	ATCAATATAA
P.gallinac	TTCTAAAGAA	GAGAGGTAGT	GACAAGAAAT	AACAATGCAA
P. lophura	TTCTAAAGAA	GAGAGGTAGT	GACAAGAAAT	AACAATGCAA
P. catheme	TTCTAAAGAA	GAGAGGTAGT	GACAAGAAAT	AACAAGGTAA
Unidentifi	TTCTAAAGAA	GAGAGGTAGT	GACAAGAAAT	AACAATGCAA
Unidentifi	TTCTAAAAAA	GAGAGGTAGT	GACAAGAAAT	AACGATGCAA
 525 535 545 555
P. malaria	GGCCAAATTT	TGGTTTTGCA	ATTGGAATGA	TGGGAATTTA
P. vivax	GACCAAAA-C	TGGTTTTGTA	ATTGGAATGA	TGGGAATTTA
P. ovale	GGCCATTTCA	TGGTTTTGTA	ATTGGAATGA	TGGGAATTTA
P.reichen	GGCCAAATTT	TGGTTTTGTA	ATTGGAATGG	TGGGAATTTA
P. fragile	GGCCAAT--C	TGGCTTTGTA	ATTGGAATGA	TGGGAATTTA
P. knowles	GGCCAAT--C	TGGCTTTGTA	ATTGGAATGA	TGGGAATTTA
P. cynomol	GGCCAAT--C	TGGCTTTGTA	ATTGGAATGA	TGGGAATTTA
P. simium	GACCAAAA-C	TGGTTTTGTA	ATTGGAATGA	TGGGAATTTA
P.berghei	GGCCAAATTT	TGGTTTTATA	ATTGGAATGA	TGGGAATTTA
P. yoelii	GGCCAAATTT	TGGTTTTATA	ATTGGAATGA	TGGGAATTTA
P. chabaud	GGCCAAATTT	TGGTTTTATA	ATTGGAATGA	TGGGAATTTA
P.gallinac	GGCCAAATTT	TGGTTTTGCA	ATTGGAATGA	TAGGAATTTA
P. lophura	GGTCAATTTT	TGATTTTGCA	ATTGGAATGA	TAGGAATTTA
P. catheme	GGTCAATTTT	TGGCTTTATC	ATTGGAATGA	TAGGAATTTA
Unidentifi	GGCCAAATTT	TGGTTTTGCA	ATTGGAATGA	TAGGAATTTA
Unidentifi	GGCCAAATTT	TGGTTTTGCA	ATTGGAATGA	TAGGAATTTA

 565 575 585 595
P. malaria	AAACCTTCC-	CAGAAGG-CA	ATTTGGAGGGC	AAGTCTGGTG
P. vivax	AATCCTTCC-	CATAATA-CA	ATTTGGAGGGC	AAGTCTGGTG
P. ovale	AAACCTTCC-	CAAAATT-CA	ATTTGGAGGGC	AAGTCTGGTG
P.reichen	AAACCTTCC-	CAGAGTAACA	ATTTGGAGGGC	AAGTCTGGTG
P. fragile	AAACCTTCC-	CAAAATT-CA	ATTTGGAGGGC	AAGTCTGGTG
P. knowles	AAACCTTCC-	CAAAATT-CA	ATTTGGAGGGC	AAGTCTGGTG
P. cynomol	AAACCTTCC-	CAAAACT-CA	ATTTGGAGGGC	AAGTCTGGTG
P. simium	AATCCTTCC-	CATAATA-CA	ATTTGGAGGGC	AAGTCTGGTG
P.berghei	AAACCTTCC-	CAAAAAT-CA	ATTTGGAGGGC	AAGTCTGGTG
P. yoelii	AAACCTTCC-	CAAAAAT-CA	ATTTGGAGGGC	AAGTCTGGTG
P. chabaud	AAACCTTCC-	CAAAAAT-CA	ATTTGGAGGGC	AAGTCTGGTG
P.gallinac	AAAACCTTCC-	TAAAGTAACA	ATTTGGAGGGC	AAGTCTGGTG
P. lophura	AAACCTTCCC	TAAAGTAACA	ATTTGGAGGGC	AAGTCTGGTG
P. catheme	AAAACCTTCC-	TAAAGTAACA	ATTTGGAGGGC	AAGTCTGGTG
Unidentifi	AAAACCTTCC-	TAAAGTAACA	ATTTGGAGGGC	AAGTCTGGTG
Unidentifi	AAAACCTTCC-	TAAAGTAACA	ATTTGGAGGGC	AAGTCTGGTG
 605 615 625 635
P. malaria	CCAGCAGCCG	CGGTAATTCC	AGCTCCAATA	GCGTATATTA
P. vivax	CCAGCAGCCG	CGGTAATTCC	AGCTCCAATA	GCGTATATTA
P. ovale	CCAGCAGCCG	CGGTAATTCC	AGCTCCAATA	GCGTATATTA
P.reichen	CCAGCAGCCG	CGGTAATTCC	AGCTCCAATA	GCGTATATTA
P. fragile	CCAGCAGCCG	CGGTAATTCC	AGCTCCAATA	GCGTATATTA
P. knowles	CCAGCAGCCG	CGGTAATTCC	AGCTCCAATA	GCGTATATTA
P. cynomol	CCAGCAGCCG	CGGTAATTCC	AGCTCCAATA	GCGTATATTA
P. simium	CCAGCAGCCG	CG-TAATTCC	AGCTCCAATA	GCGTATATTA
P.berghei	CCAGCAGCCG	CGGTAATTCC	AGCTCCAATA	GCGTATATTA
P. yoelii	CCAGCAGCCG	CGGTAATTCC	AGCTCCAATA	GCGTATATTA
P. chabaud	CCAGCAGCCG	CGGTAATTCC	AGCTCCAATA	GCGTATATTA
P.gallinac	CCAGCAGCCG	CGGTAATTCC	AGCTCCAATA	GCGTATATTA
P. lophura	CCAGCAGCCG	CGGTAATTCC	AGCTCCAATA	GCGTATATTA
P. catheme	CCAGCAGCCG	CGGTAATTCC	AGCTCCAATA	GCGTATATTA
Unidentifi	CCAGCAGCCG	CGGTAATTCC	AGCTCCAATA	GCGTATATTA
Unidentifi	CCAGCAGCCG	CGGTAATTCC	AGCTCCAATA	GCGTATATTA
 645 655 665 675
P. malaria	AAATTGTTGC	AGTTAAAACG	CTCGTAGTTG	AATTTCAAAG
P. vivax	AAATTGTTGC	AGTTAAAACG	CTCGTAGTTG	AATTTCAAAG
P. ovale	AAATTGTTGC	AGTTAAAACG	CTCGTAGTTG	AATTTCAAAG
P.reichen	AAATTGTTGC	AGTTAAAACG	CTCGTAGTTG	AATTTCAAAG
P. fragile	AAATTGTTGC	AGTTAAAACG	CTCGTAGTTG	AATTTCAAAG
P. knowles	AAATTGTTGC	AGTTAAAACG	CTCGTAGTTG	AATTTCAAAG
P. cynomol	AAATTGTTGC	AGTTAAAACG	CTCGTAGTTG	AATTTCAAAG
P. simium	AAATTGTTGC	AGTTAAAACG	CTCGTAGTTG	AATTTCAAAG
P.berghei	AAATTGTTGC	AGTTAAAACG	CTCGTAGTTG	AAC TTCAAAG
P. yoelii	AAATTGTTGC	AGTTAAAACG	CTCGTAGTTG	AAC TTCAAAG
P. chabaud	AAATTGTTGC	AGTTAAAACG	CTCGTAGTTG	AAC TTCAAAG
P.gallinac	AAATTGTTGC	AGTTAAAACG	CTCGTAGTTG	AATTTCAAAG
P. lophura	AAATTGTTGC	AGTTAAAACG	CTCGTAGTTG	AATTTCAAAG
P. catheme	AAATTGTTGC	AGTTAAAACG	CTCGTAGTTG	AATTTCAAAG
Unidentifi	AAATTGTTGC	AGTTAAAACG	CTCGTAGTTG	AATATCAAAA
Unidentifi	AAATTGTTGC	AGTTAAAACG	CTCGTAGTTG	AAC TTCAAAG

ANEXO 5 – ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS DE *ssrRNA* DAS ESPÉCIES DE *Plasmodium* DESCRITAS NO QUADRO 9 (ITEM 4.3.3)

Região amplificada: 203 - 381

Psimium	TACGTCTTGTGAGCAT-GTACTTGTTAAGCCTTTATAAGAAAAAGTTAA
Pvivax
Pknowlesi	.TTA.T.CT....TG.....-.....G.....T
Pfragile	.TTA.T.CT....TG.....-.....G.....T
Pcynomol	.TAACT.CT....TG.....C.....-..T.....T
CAP4	.TTA...GT...CAG-...T.....-..G----.-..A.CG
CAP7	.TTA...GT...CAG-...CT.....-..G----.-..A.CG
Povale	.TT..G.CT.AC.T.....-..-.....G.....T.
Pmalariae	..T..T..T.....T.....-.....G.....AT.
Pyoelli	CCG.AG.AA.T.....T.....-.....T-.-
Pberghei	.TG.AG.AA.T.....T.....-.....T-.-
Pchabaudi	CCGAGA.A-.TT.....T.....-.....TT-.-
Pmexican	..AAAA.AA.A.AT.....TC.....-.....A..G
Pfloriden	GTTAGACA.ATTTACAG...T.....-..GG-..GA..AGG...G..GC.
Pgallinac	AGGTAA.GAA..A..C...T.....-.....-
Pcatheme	AGGT...GAAA.A..C...T.....-.....-
Plophura	AGGT...GT...A..C...T.....-.....-
Pfalcipa	.TTT-A.CT.TG.ATAA...T.....G...-.....-
Preicheno	.TTA.A.CT.AG.ATAA.....G...-.....-

T-AAC-TT-AAGGAATGATAACAAAGAAGTGACACATAAAAA-GGACTCG

.....

.....T.....A...G---T...T.AT

.....T.....A...G.-G...T...T.AA

.....T.....A...G---T...T-.C

AC.CAA..C.....ACA...G---T.-TAA.TGAA

AC.CAA..C.....ACA...G---T.-TAA.TGAA

C.....T.....A...-T...TAAGT.TA

.T.....-.....A...-T...TAA.T.TC

.T.-...A.....T.....A...-T...TAT.T.TA

.T.-...A.....T.....A...-T...TAT.T.TA

.T.-...G.....T.....A...-T...TAT.T.TA

.TT.AA..A.....T.....A...G---T...TAA.T.AT

.A.TAACAC.....G.....ACA...G---T.-TAA.T-AT

.T.-T.....T.....CA...-T...TAA.ACTT

.T.....T.....GA...-T...T...ACTC

CT.....-A.....T.....CA...-T...TAA.GCT.

.T.....T.....A...G---T...TAA.T.TA

.T.....T.....A...G---T...TAA.T.TA

```

TCCC---ATTTTCT-AGTGTGTATCAATCGAGTTTCTGACCTATCAGCTT
.
.-.....T.
CT.....T.T.
GT.....T-
.AATTT.....----
.AATTT.....----
C.TT.....---
G-ATTT.....---
.TAT.....---
CTAT.....---
CTAT.....---
--ATTT.....A--
.TATTTT.....A--
.GTTTT.....---
CGTTTC.....---
CGT.TT.....---
.TTT.....---
.TTT.....---

```

[illegible]

ANEXO 6 – QUADRO DAS SIMILARIDADES (EM %) ENTRE SEQUÊNCIAS DE *ssrRNA* DAS ESPÉCIES DE *Plasmodium*
DESCRITAS NO QUADRO 9 (ITEM 4.3.3)

	Psi	Pvi	Pkn	Pfr	Pcy	CAP4	CAP7	Pov	Pma	Pyo	Pbe	Pch	Pme	Pfl	Pga	Pca	Plo	Pfa
Psi																		
Pvi	98,84																	
Pkn	85,55	86,63																
Pfr	84,57	85,63	94,77															
Pcy	82,66	83,72	92,31	91,28														
CAP4	68,54	69,49	74,71	73,45	73,84													
CAP7	67,98	68,93	74,14	72,88	73,26	99,37												
Pov	80,35	81,40	84,62	84,30	84,43	75,15	74,56											
Pma	81,25	82,29	84,21	82,29	84,12	77,06	76,47	89,29										
Pyo	78,86	79,89	80,70	79,89	81,07	73,53	72,94	85,03	85,80									
Pbe	78,86	79,89	81,29	81,61	82,25	74,12	73,53	86,83	86,39	98,16								
Pch	76,57	77,59	80,12	79,89	80,47	72,35	71,76	83,83	84,02	95,09	94,48							
Pme	73,03	74,01	79,19	76,84	78,49	78,57	77,98	78,82	83,43	82,35	82,94	80,59						
Pfl	63,89	64,80	68,75	67,04	68,79	76,47	75,88	70,35	73,26	71,51	71,51	72,67	73,84					
Pga	76,84	77,84	79,19	76,70	78,95	75,88	75,29	81,07	84,62	86,31	85,71	83,93	82,94	73,26				
Pca	78,98	80,00	80,23	79,43	81,18	73,53	72,94	82,74	84,52	84,52	85,12	83,33	80,00	69,19	93,45			
Plo	78,53	79,55	79,77	78,98	80,12	76,47	75,88	83,43	85,21	83,93	84,52	82,74	80,00	69,77	92,31	92,26		
Pfa	77,71	78,74	84,80	83,91	84,62	77,19	76,61	87,43	85,80	86,83	87,43	86,23	80,70	74,42	85,21	83,93	84,02	
Pre	78,86	79,89	86,55	85,63	85,80	77,78	77,19	89,22	85,80	85,63	86,23	85,63	81,29	73,84	84,02	83,93	83,43	97,59